

Breno Souza Salgado

Análise da expressão de MDR1, MRP1, MRP2 e da
superfamília EGFR nos carcinomas mamários
esporádicos de cadelas

Tese em regime de co-tutela apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia, e apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientadoras: Profas. Dras. Noeme Sousa Rocha e Maria de Fátima Gartner

Coorientadores: Profs. Drs. Rafael Malagoli Rocha e Deilson Elgui de Oliveira

Botucatu

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Salgado, Breno Souza.

Análise da expressão de MDR1, MRP1, MRP2 e da superfamília EGFR nos carcinomas mamários esporádicos de cadelas / Breno Souza Salgado. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Noeme Sousa Rocha e Maria de Fátima Gartner

Coorientador: Deilson Elgui de Oliveira

Coorientador: Rafael Malagoli Rocha

Capes: 50503022

1. Mamas - Câncer. 2. Cão - Doenças. 3. Drogas - Resistência em células cancerosas. 4. Tumores em animais.

Palavras-chave: Cão; Neoplasias mamárias; Receptores tirosina cinase; Resistência à múltiplas drogas.

Breno Souza Salgado

**Análise da expressão de MDR1, MRP1, MRP2 e da superfamília
EGFR nos carcinomas mamários esporádicos de cadelas**

Tese em regime de co-tutela apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia, e apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientadoras: Profs. Dras. Noeme Sousa Rocha e Maria de Fátima Gärtner

Comissão examinadora:

Prof.(a) Dr.(a)

Universidade

Prof.(a) Dr.(a)

Universidade

Prof.(a) Dr.(a)

Universidade

Botucatu, _____ de _____ de 2015

AGRADECIMENTOS

Esse estudo de doutorado mudou minha vida, pois aconteceu em um momento de muitas transformações e eu não seria capaz de finalizá-lo sem o suporte e supervisão que tive desta lista colossal de pessoas.

Agradeço à Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, Brasil, e com o Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, ICBAS, da Universidade do Porto, no Porto, em Portugal, locais nos quais realizei minha investigação.

Agradeço o suporte da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Brasil, a qual providenciou auxílio financeiro.

Gostaria de agradecer às minhas supervisoras Noeme Sousa Rocha e Maria de Fátima Gärtner, pelo apoio, oportunidade, amizade, compreensão, paciência e pela orientação, de modo que eu pudesse concluir esta etapa.

Houve auxílio fundamental por parte da Fundação Antônio Prudente do Hospital A. C. Camargo, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, UNESP – Botucatu, Brasil, e do Hospital Escola de Medicina Veterinária da Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá – FEPI, para o bom andamento e avaliação dos pacientes e casos aqui relacionados.

Gostaria de agradecer às professoras Márcias Guimarães Silva e Denise Fecchio, coordenadoras do Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP, pela compreensão, boa vontade e orientação em diversos momentos, bem como aos funcionários da Pós-graduação da UNESP Botucatu e da Universidade do Porto pelo auxílio constante, em especial à Vânia Soler, Janete Aparecida Silva e Ana Paula Pereira, que sempre estiveram de prontidão com a maior paciência possível para me ajudar a solucionar os meus problemas.

Também gostaria de agradecer à Suely Nonogaki pelo seu auxílio com as reações imunoistoquímicas e à Maria do Rosário de Moraes pelo auxílio na condução da avaliação da sobrevida dos animais, ajudando no contato direto com os proprietários.

Aos meus amigos, em particular Felipe Leite, Luiz Carlos Scaldaferrri e Délcio Bueno, pelas conversas nos momentos difíceis e pela sinceridade e entendimento de sempre, e João

Marcelo e Larissa, que além da amizade cuidavam do meu cão Thor para mim nos momentos em que eu trabalhava. Não há palavras para expressar o quanto isto significa para mim.

Ao amigo e irmão Paulo Ricardo de Oliveira Bersano, pelo auxílio, amizade e orientação ao longo de praticamente uma década, os quais sempre serão lembrados por mim.

Aos amigos de Botucatu, Marcela Marcondes, Claudia Cordioli, Fabrizio Grandi, Giovane Olivo, Rodrigo Volpato e Priscilla Kobayashi, pelas boas conversas e risadas em diversas ocasiões.

Aos colegas e amigos Maria Cristina Resck, Gabriel Carvalho, Rodolfo Malagó, Thiago Anacleto, Cristiano Nicomedes, Myrian Iser e Angela Akamatsu que acreditam em mim e sempre possuem uma palavra de apoio.

Aos amigos portugueses Fátima Carvalho, Irina Amorim, Célia Lopes, Luisa Mariano, pelo acolhimento, ensinamentos, amizade. Só tenho gratidão e admiração por vocês.

À Professora Maria Cecília Rui Luvizotto, que sempre me apoiou e sempre me estimulou, pessoa a qual sempre considerarei como uma de minhas mães.

Aos meus pais José e Elme pelo suporte e palavras. Ao meu irmão Victor e à minha cunhada Angélica, simplesmente por se importarem comigo.

À minha madrinha e “segunda mãe” Ellen e à minha avó Branca, donas da “minha casa” e do “meu canto”, no qual eu busco estar presente sempre que possível. Aos meus tios e tias, primos e primas, pela convivência e amizade.

Não menos importantes, aos meus cães Thor e Cocada (“Coca”), que nestes últimos anos se fizeram e se fazem presentes na minha vida, e a todos os cães e proprietários que participaram deste estudo, permitindo que fosse possível sua realização.

E, finalmente, à minha esposa Lidianne, que por seis anos já está ao meu lado, dando suporte, com sua amizade e companheirismo sem fim. Te amo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura dos membros da família EGFR.....	39
Figura 2 – Representação esquemática do funcionamento dos transportadores ABC na célula. Adaptado de FLETCHER et al., 2010.....	49
Figura 3 – Representação esquemática da estrutura dos membros da superfamília ABC.....	50
Figura 4 – Eventos realizados durante a condução do estudo ao longo do tempo. E1: Entrevista seis meses após a mastectomia; E2: Entrevista doze meses após a mastectomia; E3: Entrevista dezoito meses após a mastectomia.....	59
Figura 5 – Distribuição percentual dos casos de tumores mamários por raça utilizados neste estudo.....	64
Figura 6 – Imunoexpressão negativa para EGFR, com células sem evidências de marcação membranar. Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.....	65
Figura 7 – Expressão de EGFR com resultado 1+, com marcação membranar ocasional. Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris....	65
Figura 8 – Expressão de HER2 com resultado 2+, com marcação membranar incompleta, porém acentuada. Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.....	66
Figura 9 – Expressão de HER2 com resultado 3+, com marcação membranar consistente e completa e marcação citoplasmática acentuada. Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.....	66
Figura 10 – Quantidade de casos com coexpressão de membros da família EGFR dentre as possibilidades de expressão simultânea.....	67
Figura 11 – Curvas de sobrevida e expressão de membros da família EGFR. A) EGFR/HER1; B) HER2; C) Coexpressão de EGFR/HER1, HER2 e HER4; D) Coexpressão de EGFR/HER1, HER2, HER3 e HER4.....	71
Figura 12 – Carcinoma mamário canino com expressão acentuada de glicoproteína-P ao longo da membrana e em menor proporção no citoplasma. Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.....	72
Figura 13 – Expressão positiva acentuada de MRP1, com reação intensa na membrana e citoplasma. Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.....	72

Figura 14 – Expressão positiva fraca de MRP2, principalmente no citoplasma e ocasionalmente na membrana (seta). Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.....	73
Figura 15 – Curvas de sobrevida e expressão de transportadores ABC. Relação da expressão de (A) Glicoproteína-P, (B) MRP1 e (C) MRP2 com a sobrevida global dos pacientes.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema TNM preconizado pela OMS (OWEN, 1980).....	28
Tabela 2 – Sistema TNM modificado para neoplasias mamárias caninas.....	28
Tabela 3 – Classificação do subtipo de câncer de mama.....	35
Tabela 4 – Anticorpos primários utilizados para a coloração da superfamília ABC e da família EGFR.....	60
Tabela 5 – Classificação da intensidade de marcação de acordo com o <i>EGFR PharmDx</i>	61
Tabela 6 – Intensidade de marcação de acordo com o <i>HercepTest</i>	61
Tabela 7 – Valores de <i>P</i> de acordo com a expressão simultânea de EGFR/HER1, HER2, HER3 e HER4.....	67
Tabela 8 – Expressão de membros da família EGFR em relação às características clinicopatológicas.....	68
Tabela 9 – Características clinicopatológicas dos pacientes de acordo com a coexpressão de membros da família EGFR.....	69
Tabela 10 – Características clinicopatológicas dos pacientes com coexpressão simultânea de mais de dois membros da família EGFR.....	70
Tabela 11 – Características clinicopatológicas de acordo com a expressão de proteínas transportadoras ABC.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - graus Celsius

ABC - cassete ligador de ATP

ABCC1 - cassete ligador de ATP 1 da subfamília C

ABCC2 - cassete ligador de ATP 2 da subfamília C

ABCG1 - gene de cassete ligador de ATP 1

ABCG2 - gene de cassete ligador de ATP 2

ADCC - citotoxicidade celular mediada por anticorpo

ADP - difosfato de adenosina

AIB1 –amplificado na mama 1

Akt – proteína cinase de serina/treonina

ATP - trifosfato de adenosina

BCR-ABL - receptor de célula B/homologo do oncogene viral da leucemia murina de Abelson, cromossomo filadélfia

BRCA1 - câncer de mama 1, início precoce

BRCA2 - câncer de mama 2, início precoce

BCRP - proteína de resistência ao câncer de mama

c-erbB-2 - receptor de fator de crescimento epidérmico 2

c-erbB-3 - receptor de fator de crescimento epidérmico 3

c-erbB-4 - receptor de fator de crescimento epidérmico 4

Ca. - carcinoma

CA125 - antígeno do carboidrato 125

CAAF - citologia aspirativa por agulha fina

cdk - cinase ciclina-dependente

CEA - Antígeno carcinoembrionário

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cm - centímetros

Cta – domínio citoplasmático A

Ctb – domínio citoplasmático B

DAB - 3'3 diaminobenzidina

DLN - Domínio ligante de nucleotídeo

DMV - densidade microvascular

DNA - ácido desoxirribonucleico

DTM - domínio transmembrânico

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EGFR - receptor de fator de crescimento epidérmico

erbB-1 - receptor de fator de crescimento epidérmico 1

erbB-2 - receptor de fator de crescimento epidérmico 2

erbB-3 - receptor de fator de crescimento epidérmico 3

erbB-4 - receptor de fator de crescimento epidérmico 4

G1 - gap 1 (primeiro intervalo no ciclo celular)

HER1 - receptor de fator de crescimento epidérmico 1

HER2 - receptor de fator de crescimento epidérmico 2

HER3 - receptor de fator de crescimento epidérmico 3

HER4 - receptor de fator de crescimento epidérmico 4

IHC - imunoistoquímica

JMa – justamembranar A

JMb – justamembranar B

kDa - quilodáltons

MAP - proteína ativadora de mitose

MAPK - cinase da proteína ativadora de mitose

M - mitose

M - molar

N - número

MDR1 - proteína de resistência à múltiplas drogas 1

mm - milímetros

MRP - proteína associada à resistência contra múltiplas drogas

MRP1 - proteína associada à resistência contra múltiplas drogas 1

MRP2 - proteína associada à resistência contra múltiplas drogas 2

NK - natural killer, assassinas naturais

pH - potencial hidrogeniônico

OMS - Organização Mundial da Saúde

PI3K - fosfatidil inositol 3' cinase

PI3KCA - fosfatidil inositol 3' cinase catalítica-alfa

PLC - Fosfolipase C

P-gp - glicoproteína-P

PTEN – fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato

Rb - retinoblastoma

RE - receptor de estrógeno

RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro

RP - receptor de progesterona

S - síntese

SNP - polimorfismo de nucleotídeo único

SRC1 - coativador de receptor de esteroide 1

SRC3 – coativador de receptor de esteroide 3

SRD – Sem raça definida

STAT - transdutor de sinal e ativador de transcrição

TKI - receptor tirosina cinase

TNM - tumor, linfonodo e metástase

VEGF - fator de crescimento de endotélio vascular

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 CÂNCER DE MAMA NAS CADELAS	18
1.1.1 Patogenia das neoplasias mamárias nas cadelas	18
1.1.1.1 Proto-oncogenes	19
1.1.1.2 Supressores tumorais	19
1.1.1.3 Fatores relacionados com o reparo do DNA	20
1.1.1.4 Fatores relacionados com a angiogênese	21
1.1.1.5 Fatores endócrinos	22
1.1.1.6 Fatores nutricionais	23
1.1.2 Apresentação, características clínicas e estadiamento	24
1.1.2.1 Histotipo e prognóstico	24
1.1.2.2 Estadiamento clínico e o sistema TNM	28
1.1.3 Oncologia comparada	31
1.1.4 Biomarcadores do câncer	32
1.1.4.1 Biomarcadores do câncer de mama	34
1.2 TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA CANINO	35
1.2.1 Tratamento convencional	35
1.2.2 Quimioterapia antineoplásica	36
1.2.3 Terapias alvo	37
1.2.3.1 Resistência à terapia alvo	38
1.3 A FAMÍLIA EGFR	38
1.3.1 EGFR/HER1	39
1.3.2 HE2/neu	40
1.3.2.1 HER2 e receptores hormonais	41

1.3.3 HER3	43
1.3.4 HER4	43
1.3.5 Família EGFR e dimerização	44
1.3.6 Sinalização para EGFR no câncer de mama e seus inibidores	45
1.3.6.1 Trastuzumab	46
1.3.6.2 Papel do Trastuzumab no tratamento do câncer de mama na mulher	47
1.3.6.3 Resistência ao Trastuzumab	48
1.4 INTRODUÇÃO À SUPERFAMÍLIA ABC	49
1.4.1 Visão geral sobre os transportadores ABC	49
1.4.2 Estrutura dos transportadores ABC	50
1.4.3 Mecanismo de ação dos transportadores ABC	51
1.4.4 Transportadores ABC de mamíferos	51
1.4.4.1 Glicoproteína-P/MDR1/ABCG1	51
1.4.4.2 MRP1/ABCC1	52
1.4.4.3 MRP2/ABCC2/cMOAT	53
1.4.4.4 BCRP/ABCG2	54
1.4.5 Transportadores ABC e câncer de mama	55
1.4.5.1 Transportadores ABC e neoplasias caninas	55
1.4.6 Transportadores ABC e a resistência à terapia alvo com inibidores tirosina cinase	56
 CAPÍTULO II: INVESTIGAÇÃO	
1 OBJETIVOS	58
1.1 OBJETIVO GERAL	58
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58

2 MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 ASPECTOS ÉTICOS E ORIGEM DO MATERIAL EM ESTUDO	58
2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	58
2.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	59
2.4 IMUNOISTOQUÍMICA	59
2.4.1 Técnica	59
2.4.2 Avaliação microscópica	61
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62

CAPÍTULO III: RESULTADOS

1 AVALIAÇÃO CLÍNICA E PATOLÓGICA	64
2 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA	64
2.1 Família EGFR	64
2.1.1 Associação entre membros da família EGFR e características clinicopatológicas	68
2.1.2 Associação entre membros da família EGFR e sobrevida	71
2.2 Superfamília ABC	71
2.2.1 Associação entre a expressão da superfamília ABC e parâmetros clinicopatológicos	73
2.2.2 Associação entre transportadores ABC e sobrevida	75

CAPÍTULO IV: DISCUSSÃO GERAL

1 FAMÍLIA EGFR	77
2 SUPERFAMÍLIA ABC	78

CAPÍTULO V: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. CONCLUSÕES	82
2. PERSPECTIVAS	83
2.1 Superfamília ABC como biomarcador do câncer e na resposta ao tratamento	83
2.2 Membros da família EGFR como biomarcadores do câncer	83
 REFERÊNCIAS	 84
 ANEXO I – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	 114
ANEXO II – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	124
APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	126

RESUMO

SALGADO, B. S. **Análise da expressão de MDR1, MRP1, MRP2 e da superfamília EGFR nos carcinomas mamários esporádicos de cadelas.** 2015. 127 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

Os tumores mamários constituem a neoplasia mais comum das cadelas, sendo que mais da metade são consideradas malignas e com muitos animais apresentando morte associada à doença. Estes tumores geralmente são tratados cirurgicamente por meio de mastectomia, porém os resultados frequentemente não são satisfatórios. Visto que novas abordagens terapêuticas são necessárias nos tumores mamários caninos, especialmente no que diz respeito ao tratamento adjuvante e à terapia alvo, o conhecimento acerca de possíveis componentes relacionados com a resistência à fármacos e que funcionem como possíveis alvos moleculares para a terapia deve ser garantido. Em vista disso, o objetivo da pesquisa descrita nesta tese foi caracterizar o papel da família de receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR) e da superfamília de transportadores ligadores de ATP (ABC) nos tumores mamários caninos como biomarcadores do câncer e sua relação com o desfecho da doença para caracterizar sua patobiologia. Neste estudo, os receptores tirosina cinase EGFR/HER1, HER2, HER3 e HER4, assim como as proteínas da família ABC glicoproteína-P/MDR1, MRP1 e MRP2 foram avaliadas por meio de imunistoquímica, sendo os resultados relacionados com características clinicopatológicas em 43 tumores. A expressão simultânea de todos os membros da família e a coexpressão de EGFR/HER1, HER2 e HER4 se mostraram associadas com um desfecho desfavorável para a doença. A expressão de glicoproteína-P e MRP1 se apresentaram relacionadas com características clinicopatológicas nos tumores estudados, ao passo que a expressão de MRP1 foi caracterizada como um indicador prognóstico independente nestes tumores. Em síntese, esta tese fornece novas informações acerca da expressão da família EGFR nos tumores mamários caninos e associa os transportadores ABC com um desfecho desfavorável para a doença, consequentemente sugerindo que eles também podem estar relacionados com o prognóstico nos pacientes com câncer de mama.

Palavras-chave: c-erbB-2; c-erbB-3; c-erbB-4; receptores tirosina cinase; P-gp; ABCC2; resistência à múltiplas drogas; neoplasias mamárias; cão.

ABSTRACT

SALGADO, B. S. Analysis of MDR1, MRP1, MRP2, and EGFR family expression in canine spontaneous mammary tumors. 2015. 127 p. Thesis (PhD) – Medical School of Botucatu – São Paulo State University, Botucatu, 2015.

Mammary tumors comprise the most common neoplasms in female dogs with more than half with malignant characteristics. Such tumors are usually treated using surgical mastectomy, but results are frequently not satisfying. Since new therapeutical approaches are needed in canine mammary tumors, especially regarding adjuvant therapy and targeted therapy, an understanding regarding possible cellular components related to drug resistance and that work as possible targets for therapy is straightforward to achieve. Accordingly, the aim of the research described in this thesis was to study the possible role of epidermal growth factor receptor family (EGFR) and ATP-binding cassette (ABC) superfamily members in canine mammary tumors as cancer biomarkers and its relation with disease outcome in order to better characterize their pathobiology looking forward the future improve in canine mammary cancer treatment. In this study, tyrosine kinase receptors EGFR/HER1, HER2, HER3, and HER4, as well ABC transporters P-glycoprotein/MDR1, MRP1, and MRP2 were immunohistochemically evaluated and results were related with clinicopathologic characteristics and overall survival in 43 tumors. Expression of all family members and simultaneous expression of EGFR/HER1, HER2, and HER4 were related with a poor disease outcome. P-glycoprotein and MRP1 expression showed to be related with clinicopathologic features and MRP1 was characterized as a independent prognostic indicator in such tumors. In summary, this thesis provides new information about EGFR family expression in canine mammary tumors and associates ABC transporters with a poor disease outcome, consequently suggesting that they may also be related to prognosis in patients with mammary cancer.

Keywords: c-erbB-2; c-erbB-3; c-erbB-4; tyrosine kinase receptors; multidrug resistance; P-gp; ABC2; mammary neoplasm; dog.

CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. CÂNCER DE MAMA NAS CADELAS

As neoplasias mamárias das cadelas são as neoplasias que mais frequentemente afetam as fêmeas da espécie, particularmente nos países nos quais os animais não são rotineiramente castrados quando jovens. Existe grande heterogeneidade histológica nestas neoplasias, sendo 40 a 50% dos casos considerados como malignos (McCARTHY et al., 2000; MISDORP, 2002; SORENMO, 2003).

Os cães possuem cinco pares de glândulas mamária (torácicas craniais, torácicas caudais, abdominais craniais, abdominais caudais e inguinais) e a incidência documentada de múltiplos tumores é de até 60% (FOWLER et al., 1974; BENJAMIN et al., 1999). Apesar da ocorrência relativamente comum de múltiplos tumores mamários sincrônicos, as informações sobre a inter-relação entre os tumores são escassas. Muitos relatos demonstram que eles são neoplasias primárias independentes uma das outras com características histológicas diferentes, sendo recomendado que todos os tumores sejam biopsiados de modo a determinar sua malignidade (FOWLER et al., 1974; MISDORP et al., 1999).

Apesar das pesquisas constantes, muitas questões permanecem acerca da patobiologia dos tumores mamários caninos. Ainda não é totalmente claro como os carcinomas mamários se desenvolvem a partir das glândulas mamárias normais e quais são as características que permitem que um carcinoma promova metástases.

1.1.1 Patogenia das neoplasias mamárias nas cadelas

Pesquisas focadas na origem celular e mecanismos moleculares das neoplasias identificaram diversas moléculas isoladas e vias de sinalização, especialmente nos seres humanos e camundongos. Nas cadelas, assim como na mulher, a proliferação no epitélio não neoplásico é regulada por diversos mecanismos, incluindo aqueles associados aos reguladores do ciclo celular (SARLI et al., 2002). As neoplasias mamárias são caracterizadas pela proliferação celular aumentada quando comparado com o epitélio mamário não neoplásico. As células neoplásicas, tais como as células luminais mamárias, apresentam níveis de expressão aumentados ou produtos gênicos promotores de crescimento (proto-oncogenes) hiperativos, bem como podem também apresentar níveis de expressão diminuídos ou produtos gênicos inibidores do crescimento (supressores tumorais) envolvidos na promoção do crescimento (CULLEN et al., 2002). Entretanto, o impulso iniciador para o aumento na proliferação celular nas células mamárias não é claro.

1.1.1.1 Proto-oncogenes

Proto-oncogenes promotores do crescimento estão diretamente envolvidos na progressão do ciclo celular, tais como os membros da família dos reguladores de ciclo celular (ciclina, cinases ciclina-dependentes [CDK], proteína do retinoblastoma [Rb]), ou são membros de redes moleculares que induzem indiretamente o avanço no ciclo celular, tais como as vias de sinalização dos fatores de crescimento. Dos potenciais proto-oncogenes diretamente envolvidos na progressão do ciclo celular, a ciclina A e a ciclina D1 foram avaliadas nos tumores mamários caninos, mostrando-se aumentadas nos tumores malignos (MURAKAMI et al., 2000).

Devido a sua relevância no câncer de mama da mulher, a expressão do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2) e sua relação com a carcinogênese mamária tem sido estudada nos tumores mamários da cadela. A proteína HER2 está superexpressa em 25% dos cânceres de mama nas mulheres, sendo que essa superexpressão está associada com um prognóstico ruim (FERRETTI et al., 2007).

Além de HER2, outras proteínas relacionadas com fatores de crescimento foram demonstradas como alteradas e relacionadas com a carcinogênese mamária na espécie canina, tais como os receptores para fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-) 1 e 2 (MOL et al., 1997).

1.1.1.2 Supressores tumorais

A desregulação da proliferação celular nas células não neoplásicas é direcionada por diversas vias moleculares, incluindo pontos de checagem no ciclo celular e diferentes supressores tumorais. Um dos supressores tumorais e inibidores do crescimento mais bem caracterizados na literatura é o gene TP53 e seu produto p53. Esta proteína é ativada por diferentes vias, incluindo o estresse oxidativo e o dano ao DNA, levando à senescência irreversível no ciclo celular (VOUSDEN & PRIVES, 2009). Além disso, a morte celular direcionada por p53 é mediada pelo aumento na transcrição de p21, um inibidor da ciclina E/Cdk2 no ponto de checagem da fase de transição entre G1 – M. O impacto da expressão de p53 e de sua atividade funcional nos tumores mamários das cadelas tem sido estudado extensivamente, porém sua importância prognóstica é controversa.

A proteína p21 é superexpressa nos carcinomas mamários caninos metastáticos quando comparada com a expressão em adenomas e nas metástases nodais (KLOPFLEISCH & GRUBER, 2009). Este aumento pode, na realidade, representar uma tentativa de inibir o avanço no ciclo celular induzida por p53. O inibidor de cinase ciclina-dependente p27 é

Breno Souza Salgado

regulado por estímulos extracelulares, tais como o fator de crescimento transformante- β , porém não em resposta ao p53. De maneira semelhante a p21, a proteína p27 regula o avanço no ciclo celular por meio da interação com a ciclina E/Cdk2, mas também pela interação com a ciclina D/Cdk4. Ademais, a expressão de p27 é reduzida nos carcinomas metastáticos e nos seus focos secundários, bem como nos adenomas, indicando que a perda da expressão de p27 é um evento precoce na carcinogênese mamária canina (KLOPFLEISCH & GRUBER, 2009; KLOPFLEISCH et al., 2010).

De acordo com observações realizadas *in vitro*, mutações no gene que codifica para p16, um inibidor do ciclo celular na transição entre as fases G1 – S indicam que ele pode estar associado com a carcinogênese mamária (DELNNOCENTES et al., 2009; AGARWAL et al., 2012).

1.1.1.3 Fatores relacionados com o reparo do DNA

A instabilidade genômica é uma característica fundamental das células neoplásicas (JACKSON & BARTEK, 2009), porém as causas e os mecanismos para essa instabilidade aparentam ser extremamente variáveis. Carcinógenos podem induzir dano direto ao DNA (HOEJIMAKERS, 2001), ao passo que células neoplásicas em estágios mais tardios da progressão neoplásica demonstram instabilidade cromossômica quando os telômeros no tumor se tornam extremamente encurtados e favorecem fusões cromossômicas (MASER & DE PINHO, 2002). Ademais, hipóxia e reoxigenação (BRISTOW & HILL, 2008) e estresse relacionado à replicação celular (HALAZONETIS et al., 2008) também são relacionados como promotores de dano ao DNA. Entretanto, estes não são os únicos meios de promoção de dano ao DNA (que ocorre naturalmente também em células não-neoplásicas), fazendo com que ao longo da evolução diversos métodos de reparo do DNA tenham sido desenvolvidos.

Nas células não-neoplásicas a integridade do genoma e a sobrevivência da célula no microambiente são garantidas por uma rede de sensores de dano ao DNA e por enzimas reparadoras do DNA. Devido às diversas possíveis formas de dano ao DNA, diversos tipos de agentes reparadores estão disponíveis na célula, tal como a recombinação homóloga, o reparo por excisão de bases e o reparo por emparelhamento errado, dentre outros (HOEJIMAKERS, 2001; CULLEN et al., 2002).

Nas células neoplásicas, por sua vez, pode ocorrer uma inativação dos genes associados ao reparo do DNA, tanto por mutações genéticas quanto epigenéticas, acelerando, assim, a progressão para estados de mutação em outros genes (CULLEN et al., 2002; JACKSON & BATEK, 2009). Baseado na possibilidade de que os tumores mamários das

cadelas se assemelham a sua contraparte humana, pesquisas direcionadas para agentes reparadores do DNA também foram realizadas na espécie canina. Algumas mulheres apresentam cânceres na mama considerados como hereditários e associados com uma mutação germinativa nos genes de susceptibilidade ao câncer de mama 1 e 2 (BRCA1 e BRCA2) (MIKI et al., 1994). Ambos os produtos destes genes funcionam como sensores de danos ao DNA e induzem uma resposta de reparo (VENKITARAMAN, 2002) ao interagir com proteínas de reparo do DNA (SCULLY et al., 1997).

Devido à relevância na mulher, mutações nos produtos supracitados foram investigadas também nos tumores mamários caninos, porém sem relação direta sendo estatisticamente confirmada (SUGIURA et al., 2007; KLOPFLEISCH & GRUBER, 2009; RIVERA et al., 2009). Entretanto, a maioria dos estudos não focou em grupos específicos de cães. Quando isto foi feito (IM et al., 2013), relações entre BRCA1 e o câncer de mama nas cadelas foram detectadas, especialmente na raça Shih Tzu. Isto é reforçado pelo fato de que polimorfismos gênicos de nucleotídeo único (SNP) (HSU et al., 2010) e padrões diferenciados de splicing de RNAm (RIVERA et al., 2009) foram encontrados na sequência de BRCA1 e BRCA2 de tumores mamários caninos quando comparados com tecidos mamários normais na espécie.

1.1.1.4 Fatores relacionados com a angiogênese

A atividade angiogênica de uma neoplasia é o resultado da ação de fatores pró-angiogênicos ou antiangiogênicos sobre as células endoteliais ou estromais que subsequentemente podem se organizar de modo a formar brotamentos à partir dos vasos originais (GRAHAM & MYERS, 1999). Um dos mais importantes agentes estimuladores da angiogênese nos tumores mamários das cadelas é o fator de crescimento para endotélio vascular (VEGF). A análise da expressão dos receptores e ligantes que pertencem a esta família de proteínas fornece um meio indireto de caracterizar o potencial pró- e anti-angiogênico que as células e o microambiente neoplásico exercem sobre as células endoteliais. Nas cadelas com neoplasias mamárias, tanto VEGF quanto o receptor para VEGF do tipo 2 (VEGFR2/flk-1/KDR) foram investigados (RESTUCCI et al., 2002; RESTUCCI et al., 2004; MILLANTA et al., 2006; MILLANTA et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

A proteína VEGF é produzida e posteriormente se localiza no citoplasma das células epiteliais neoplásicas, células endoteliais e estromais, indicando tanto uma sinalização autócrina quanto parácrina as quais são indutoras da proliferação vascular (RESTUCCI et al., 2004; MILLANTA et al., 2010). Entretanto, os resultados acerca da sua

expressão são conflitantes, onde estudos revelam diferenças entre neoplasias benignas e malignas (RESTUCCI et al., 2004; MILLANTA et al., 2010) ou ausência de diferença entre esses grupos (SANTOS et al., 2010). De qualquer modo, a expressão diferencial entre células neoplásicas e tecido normal aparenta ser uma constante, bem como o fato da expressão de VEGF ser independente de parâmetros clinicopatológicos relacionados ao paciente e ao tumor (MILLANTA et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

Angiopietina 1 e 2 são outros fatores angiogênicos previamente estudados em neoplasias mamárias de cadelas. Ambas foram identificadas em tumores malignos, porém seu nível de expressão, distribuição ou associações com fatores clinicopatológicos não foram avaliados (KATO et al., 2006).

O suprimento sanguíneo no microambiente, por sua vez, pode ser estimado por meio da quantificação da densidade microvascular (DMV) em um tumor. Ela possui um impacto importante no metabolismo e no comportamento neoplásico. Consequentemente, a DMV foi intensamente investigada nas neoplasias mamárias da cadela. Microvasos são definidos como aqueles com diâmetro transversal menor do que 50 μ m (GRAHAM & MYERS, 1999), porém em alguns estudos pequenas vênulas foram inseridas na contagem (RESTUCCI et al., 2000; MILLANTA et al., 2010).

A contagem da vascular é relatada como a DMV média, ou seja, o número médio de microvasos por milímetro quadrado. Nos tumores mamários da cadela, a contagem da DMV é significativamente menor nos tumores benignos do que nos malignos (GRAHAM & MYERS, 1999; RESTUCCI et al., 2000). A sobrevida média de cães com contagens menores também é significativamente maior quando comparados com cães que apresentam contagem de DMV maiores (RESTUCCI et al., 2000; MILLANTA et al., 2010). Tanto a DMV quanto a sinalização de VEGF contribuem para a biologia e o comportamento dos carcinomas mamários nas cadelas. Entretanto, ao menos a expressão de VEGFR aparenta ter um efeito menor na sobrevida pós-cirurgia.

1.1.1.5 Fatores endócrinos

O desenvolvimento da maioria dos carcinomas mamários é estrógeno-dependente e a maioria dos carcinomas mamários caninos expressam receptores de estrógeno (RE) (HENDERSON et al., 1988; SARTIN et al., 1992; NIETO et al., 2000), uma vez que a atividade do RE é a de estímulo para a proliferação das células luminas mamárias e sua expressão é fisiologicamente associada com a expressão de receptor de progesterona, outro indutor de mitose nas células do tecido mamário (MOHSIN et al., 2004).

A expressão de RE está associada com o estado hormonal nas cadelas, sendo que fêmeas caninas jovens não castradas tendem a possuir mais chance de apresentar neoplasias positivas para RE do que fêmeas mais velhas castradas (NIETO et al., 2000). Assume-se que há uma influência deste receptor esteroide no desenvolvimento das neoplasias mamárias devido à observação de que cadelas castradas quando ainda jovens possuem uma prevalência menor de neoplasias mamárias (SCHNEIDER et al., 1969; SORENMO et al., 2000)

Diversos estudos tentaram caracterizar o potencial prognóstico da expressão de receptor de estrógeno em tumores mamários com variadas características de malignidade. Apesar de a literatura apresentar dados conflitantes, os estudos mais recentes determinam que existe uma relação entre a diminuição na expressão de receptor de estrógeno e o aumento na malignidade quando comparando-se com mamas normais (DE LAS MULAS et al., 2005; MILLANTA et al., 2005; CHANG et al., 2009). Independentemente, a evidência de que a castração apresenta efeito protetor não é completamente aceita e não deve sempre ser utilizada como base para recomendações acerca do câncer de mama nas cadelas (BEAUVAIS et al., 2012).

1.1.1.6 Fatores nutricionais

Diversos alimentos foram relatados como relacionados ao risco de desenvolvimento de câncer de mama na mulher. A hipótese de que uma dieta rica em carboidratos pode estar relacionada ao aumento no risco de desenvolvimento de câncer de mama na mulher ao resultar em níveis aumentados de glicose e insulina no sangue data da década de 1990 (BRUNING et al., 1992). Dieta rica em gorduras, álcool, carne vermelha e carcinógenos produzidos durante o cozimento de alimentos são alguns dos fatores que podem aumentar o risco de câncer de mama, ao passo que frutas e vegetais, alimentos ricos em fibras e suplementos vitamínicos foram relacionados com um efeito protetor (HANF & GONDER, 2005; PIERCE et al., 2007; JEVTIC et al., 2010). No ano de 2010, o relatório do Fundo Mundial de Pesquisa em Câncer concluiu que não existem evidências suficientes para relacionar qualquer dieta ao risco de desenvolvimento do câncer de mama (WCRF, 2010).

Nos cães, o papel da nutrição na incidência ou no prognóstico dos tumores mamários também foi investigado (PEREZ-ALLENZA et al., 2000), porém de maneira menos ampla. Em um estudo caso-controle realizado com cães que apresentavam displasias ou tumores mamários (PEREZ-ALLENZA et al., 1998), o consumo de uma dieta caseira rica em proteínas de origem bovina e suína e pobres em proteínas de frango se mostrou associada com uma incidência maior de tumores mamários quando comparado com a utilização de

Breno Souza Salgado

rações comerciais. Entretanto, o efeito inverso foi observado em outro estudo caso-controle (SONNENSCHNEIN et al., 1991) realizado com cães que apresentavam tumores mamários malignos, nos quais a ingestão de dieta rica em gordura foi inversamente relacionada com o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias.

Mais recentemente, um estudo observou que quando se comparam cães alimentados com rações comerciais e dietas caseiras, há uma peroxidação lipídica maior nos tecidos neoplásicos em relação às mamas normais (KARAYANNOPOULOU et al., 2013). Uma vez que fatores dietéticos tais como lipídeos e vitamina E estão relacionados com a peroxidação lipídica que ocorre nos casos de neoplasia mamária, é possível sugerir que a utilização de dietas balanceadas (tais como as rações comerciais) podem ser mais protetoras contra danos oxidativos do que dietas caseiras.

1.1.2 Tipo tumoral, características clínicas e estadiamento

1.1.2.1 Histotipo e prognóstico

Cerca de 50% das neoplasias documentadas são benignas, podendo ser classificadas como adenomas, papilomas ductais (raramente observados), fibroadenomas ou tumores mistos benignos. Os adenomas podem ser do tipo simples (menos frequente), composto por células epiteliais ou mioepiteliais; do tipo complexo (mais frequente), composto por células epiteliais e mioepiteliais; ou ainda do tipo basaloide (raramente observado) (HELLMÉN, 2005). Os fibroadenomas podem ser classificados em dois subtipos a dizer pericanalicular e intracanalicular. Os tumores mistos benignos são frequentemente observados nas cadelas, sendo compostos por células epiteliais de caráter benigno (luminais e/ou mioepiteliais) formando ductos e células mesenquimais produtoras de matriz mixóide, cartilaginosa e/ou tecido ósseo. Algumas vezes, tecido similar ao hematopoiético pode ser visualizado no tecido ósseo (MISDORP et al., 1999; GRANDI et al., 2010).

Por sua vez, 50% dos tumores são considerados como malignos, sendo usualmente classificados como carcinomas simples, complexos ou de tipo especial (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002). Todas as neoplasias mamárias malignas apresentam potencial metastático. O risco e o padrão de metástase são influenciados pelo histotipo, grau de diferenciação histológica e diversos fatores prognósticos clínicos. No geral, as neoplasias mamárias malignas de origem nas células luminais metastatizam por via linfática para linfonodos regionais e pulmões, enquanto as neoplasias mesenquimatosas metastatizam por via hematogênica diretamente para os pulmões (GOLDSCHMIDT et al., Breno Souza Salgado

2001; SORENMO et al., 2011). Os cães com neoplasias mamárias malignas possuem sobrevida significativamente menor do que cães com neoplasias benignas. A sobrevida global após dois anos documentada para as neoplasias malignas varia entre 25% e 40%, com um tempo médio de sobrevida variando de quatro a 17 meses. Entretanto, a sobrevida do animal pode ser influenciada por múltiplos fatores e pode variar significativamente dependendo do histotipo, do grau de diferenciação da neoplasia e tipo de tratamento empregado (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002; LANA et al., 2013).

Os carcinomas simples são classificados de acordo com sua diferenciação, sendo diagnosticados como carcinomas *in situ*, no qual são observadas características de malignidade, porém não há invasão da membrana basal pelas células neoplásicas, ou como carcinomas invasores, nos quais a membrana basal está invadida. Eles podem ser classificados como carcinomas tubulopapilíferos (frequentes), sólidos (comuns) e anaplásicos (incomuns). Os carcinomas anaplásicos são extremamente agressivos e o tratamento cirúrgico sozinho aparenta ter valor questionável (HELLMÉN, 2005). O carcinoma complexo é um histotipo composto tanto por células epiteliais como mioepiteliais, sendo um dos mais frequentes tipos de neoplasia mamária que afeta a cadela (MISDORP et al., 1999; HELLMÉN, 2005).

O carcinoma tubular é o tipo mais comum de neoplasia mamária canina e é caracterizada pela manutenção da morfologia dos ductos mamários ou da glândula mamária normal. Os carcinomas sólidos são menos diferenciados, não apresentam estruturas tubulares/ductais e formam lençóis de células neoplásicas agregadas de maneira sólida. O carcinoma mamário anaplásico, por sua vez, é indiferenciado, pleomórfico e infiltrativo (MISDORP et al., 1999), sendo diagnosticado histologicamente como tal por não ser classificável nas outras categorias descritas pela classificação histológica de tumores mamários caninos preconizada pela Organização Mundial da Saúde. O grau de diferenciação do epitélio nas neoplasias mamárias possui impacto no prognóstico, sendo as de pior prognóstico as neoplasias menos diferenciadas. O carcinoma *in situ* e os carcinomas tubulares possuem melhor prognóstico, enquanto os carcinomas anaplásicos possuem pior desfecho (MISDORP et al., 1999).

Os carcinomas mamários com origem nas células luminais se disseminam localmente por invasão direta através da membrana basal em direção ao tecido adjacente e promovem metástases para linfonodos regionais e órgãos distantes por meio da invasão de vasos linfáticos e sanguíneos. Apesar do conhecimento obtido sobre esta doença ter aumentando nos últimos anos, o prognóstico para pacientes com carcinoma mamário em estágio avançado permanece relativamente ruim, e as doenças localmente avançadas e com

metástases disseminadas são associadas com altas taxas de mortalidade (MISDORP, 2002). Entretanto, apesar de sua relevância, os mecanismos relacionados à progressão dos carcinomas mamários das cadelas permanecem a serem melhor esclarecidos.

Cães com carcinomas mamários que apresentam tamanho pequeno (menor do que 1 centímetro de diâmetro) e que são bem diferenciados histologicamente podem possuir prognóstico favorável com a realização somente de ressecção cirúrgica. Por sua vez, cães com neoplasias pouco diferenciadas ou indiferenciadas e que apresentam disseminação metastática possuem prognóstico desfavorável e podem requerer terapia adjuvante. Até o presente momento, não existem diretrizes ou recomendações específicas para os cães alocados no último grupo, sendo que existem poucos casos documentados relatando a efetividade de terapia adjuvante em tais cães (SORENMO, 2003).

Existem, ainda, alguns tipos especiais de carcinomas, como os carcinomas de células fusiformes, carcinoma de células escamosas, carcinoma mucinoso e carcinoma rico em lipídeos (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002). Os carcinomas de células fusiformes geralmente podem ser diferenciados dos fibrossarcomas pela expressão de filamentos de queratina, e ao menos uma parte destas neoplasias é de origem mioepitelial (relativamente raros). O carcinoma de células escamosas pode ser observado em raras ocasiões e deve ser diferenciado do carcinoma de células escamosas de origem epidérmica ou dos anexos cutâneos. O carcinoma mucinoso foi documentado nos cães, porém sua observação é rara, assim como o carcinoma rico em lipídeos, o qual é caracterizado por células neoplásicas com citoplasma vacuolizado que contém lipídeos neutros (ESPINOSA DE LOS MONTEROS et al., 2003).

Os sarcomas são mais frequentemente observados nas glândulas mamárias do cão do que em qualquer outra espécie (HELLMÉN, 2005). A causa desta característica, entretanto, é desconhecida. Fibrossarcomas e osteossarcomas são as neoplasias mais frequentes, enquanto outros tipos de sarcoma (por exemplo, condrossarcoma e lipossarcoma) são extremamente raros. Fibrossarcomas se apresentam geralmente como tumores de crescimento rápido com áreas centrais de necrose e geralmente possuem um padrão de crescimento expansivo. Por sua vez, os osteossarcomas podem ser osteossarcomas puros ou combinados, por exemplo, compostos por tecido maligno ósseo e cartilaginoso. A glândula mamária é o local mais comum da ocorrência de osteossarcoma extraesqueléticos de tecidos moles (LAGENBACH et al., 1998) e os osteossarcomas que se desenvolvem neste local se comportam como osteossarcomas apendiculares, estando associados com metástases hematógenas precoces e período curto de sobrevida (SORENMO, 2003).

Aproximadamente 75% dos sarcomas mamários dão origem à metástases distantes, que geralmente se disseminam por via sanguínea. Por sua vez, cerca de 30% dos linfonodos regionais estão acometidos ao momento do diagnóstico e há ocorrência concomitante de metástases à distância, geralmente para os pulmões. Em contraste ao câncer de mama da mulher, metástases para tecido ósseo não são frequentemente observadas apesar de serem passíveis de ocorrência. Os carcinomas anaplásicos são tidos como o histotipo neoplásico mamário mais agressivo no cão. As células acentuadamente pleomórficas estimulam desmoplasia acentuada e as células malignas frequentemente se disseminam pela via linfática, inclusive para glândulas mamárias distantes na cadeia mamária (HELLMÉN, 2005). A disseminação também pode ocorrer através dos vasos linfáticos da derme e consequentemente cruzar a linha média ventral do corpo até a cadeia mamária contralateral (HELLMÉN & SVENSSON, 1995).

Existe, ainda, a possibilidade de desenvolvimento de carcinossarcoma mamário, o qual é considerado uma neoplasia rara composta por células semelhantes a componentes epiteliais malignos (luminais e/ou mioepiteliais) e células semelhantes a elementos malignos do tecido conjuntivo, sendo que uma mescla de quaisquer componentes carcinomatosos e sarcomatosos podem ser observados (MISDORP et al., 1999; HELLMÉN, 2005). O prognóstico de cães com neoplasias mamárias que apresentam carcinossarcomas é ruim e a maioria dos animais apresenta quadro metastático em período inferior a um ano (BENJAMIN et al., 1999).

Outros histotipos de carcinomas mamários caninos que não são descritos na classificação proposta por Misdorp e colaboradores (1999) foram documentados, como o carcinoma micropapilar (CASSALI et al., 2002a; GAMA et al., 2008a; SALGADO et al., 2013), o carcinoma secretor (CASSALI et al., 1999), o carcinoma mamário com diferenciação sebácea (CHANG et al., 2007), o carcinoma lobular invasivo (RESSER et al., 2011) e o carcinoma lobular pleomórfico (CASSALI et al., 2002b; SALGADO et al., 2012). Devido aos poucos casos documentados, não se sabe ainda ao certo seu prognóstico na espécie, porém foi sugerida a possibilidade de comportamento agressivo dos carcinomas invasivos micropapilares caninos de maneira similar à sua contraparte humana, inclusive sendo relevada a possibilidade de apresentação clínica como carcinoma inflamatório em uma porção relativamente grande dos casos (GAMA et al., 2008a).

1.1.2.2 Estadiamento clínico e o sistema TNM

O estadiamento dos carcinomas mamários caninos deve ser realizado de acordo com o preconizado pelo sistema TNM de estadiamento da Organização Mundial da Saúde (OMS) para tumores caninos (OWEN, 1980) ou por uma adaptação deste sistema (WITHROW et al., 2013). Neste sistema, “T” descreve o tumor primário, especificamente o tamanho do mesmo de acordo com o que se segue: T₀ (não há evidência de tumor), T₁ (tumor menor do que 3 cm de diâmetro), T₂ (tumor com tamanho entre três e cinco cm de diâmetro), T₃ (tumor com tamanho maior do que 5 cm de diâmetro), e T₄ (carcinoma inflamatório, qualquer tamanho). A categoria “N” descreve o envolvimento de linfonodos regionais, onde N₀ é um linfonodo histologicamente normal, N₁ é um linfonodo ipsilateral positivo para a presença de metástases e N₂ categoriza envolvimento bilateral de linfonodos drenantes. A categoria “M”, por sua vez, representa a ausência ou presença de metástases à distância, onde M⁰ indica sua ausência e M¹ sua presença. O sistema TNM pode, então, ser organizado de acordo com grupos de estádios (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Sistema TNM preconizado pela OMS (OWEN, 1980)

ESTÁDIO	T	N	M
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₀ , T ₁ ou T ₂	N ₁	M ₀
III	T ₃	N ₀ ou N ₁	M ₀
IV	T ₁ , T ₂ ou T ₃	N ₀ ou N ₁	M ₁

T: tamanho do tumor; *N*: acometimento de linfonodos regionais; *M*: metástase à distância

Tabela 2. Sistema TNM modificado para neoplasias mamárias caninas

ESTÁDIO	T	N	M
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₂	N ₀	M ₀
III	T ₃	N ₀	M ₀
IV	T ₁ , T ₂ ou T ₃	N ₁	M ₀
V	T ₁ , T ₂ ou T ₃	N ₀ ; N ₁	M ₁

T: tamanho do tumor; *N*: acometimento de linfonodos regionais; *M*: metástase à distância

O estadiamento utilizando o sistema da OMS ou a versão modificada do mesmo fornece informações importantes sobre o prognóstico dos cães com carcinomas mamários. Assim como para outras neoplasias, cães com carcinomas mamários possuem pior prognóstico com o avançar do estágio clínico (KURZMAN & GILBERTSON, 1986; YAMAGAMI et al., 1996). Cães com metástases nodais (doença em estágio 4) possuem sobrevida significativamente menor do que aqueles pacientes em que metástases nos linfonodos não está presente. Adicionalmente, cães com metástases à distância (doença em estágio 5) possuem prognóstico pior do que cães que apresentam ausência de metástase nodal ou que somente apresentam metástases em linfonodos regionais.

O estadiamento completo requer a realização de hemograma incluindo contagem de hemácias, perfil bioquímico sérico e urinálise. A avaliação do tumor primário, incluindo mensuração do tamanho e avaliação histológica com determinação do tipo e grau de diferenciação histológica, bem como avaliação dos linfonodos regionais e realização de radiografias torácicas em três direcionamentos geralmente completam o estadiamento (SORENMO, 2003). O propósito do estadiamento é avaliar a condição geral de saúde do paciente e determinar a extensão da doença, sendo que os resultados do estadiamento fornecem informações prognósticas importantes que podem afetar a decisão do proprietário do animal em tratar ou não o mesmo. Adicionalmente, o estadiamento é necessário para o planejamento do tratamento adequado do paciente acometido por neoplasias mamárias (OWEN, 1980).

O estado dos linfonodos regionais possui grande impacto na sobrevida de cães com neoplasias mamárias (HELLMÉN et al., 1993; YAMAGAMI et al., 1996; MATOS et al., 2012). Diante disso, os linfonodos regionais devem ser avaliados em todos os cães com neoplasias malignas, permitindo com que o tratamento adequado possa ser instituído em animais que apresentam metástases nodais. Os métodos de avaliação dos linfonodos incluem a palpação, citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), biopsia com agulha grossa (tipo *Tru-cut*) ou pela excisão completa dos linfonodos. Entretanto, sabe-se que o exame físico sozinho é notoriamente falho na determinação do envolvimento de linfonodos, uma vez que pacientes com linfadenomegalia podem apresentar somente quadros inflamatórios, enquanto linfonodos macroscopicamente normais podem albergar doença metastática (DE FREITAS et al., 1991).

Um estudo comparou a sensibilidade e a especificidade dos quatro métodos supracitados de avaliação de linfonodos em diversos pacientes caninos apresentando tipos diferentes de neoplasias sólidas e encontrou resultados semelhantes aos observados nos seres humanos (LANGENBACH et al., 2001). A palpação se mostrou inadequada em prever a

Breno Souza Salgado

ocorrência de metástase nodal, enquanto a CAAF se mostrou um método adequado para a avaliação de linfonodos drenantes, com sensibilidade de 100% e especificidade de 96%. Este estudo incluiu cães apresentado diferentes tipos de neoplasias, porém é razoável assumir que a citologia apresenta confiabilidade semelhante nas neoplasias mamárias caninas.

Os aspirados citológicos são de fácil execução, pouco invasivos, não requerem sedação dos animais para sua realização e fornecem resultados rápidos e confiáveis. A análise citológica dos linfonodos regionais sempre deve ser realizada na avaliação dos cães com neoplasias malignas. Se o resultado citológico é positivo ou questionável a excisão cirúrgica completa dos linfonodos acometidos deve ser considerada. É controverso se a remoção de linfonodos com doença metastática no paciente oncopata aumenta sua sobrevida, entretanto a ressecção nodal pode aumentar o controle regional da neoplasia e prevenir sinais associados com o aumento progressivo no tamanho dos linfonodos (WHITE et al., 2002).

Em condições normais, o primeiro e o segundo par de glândulas mamárias (craniais) drenam para os linfonodos axilares ipsilaterais, enquanto o quarto e quinto par de glândulas mamárias (abdominais caudais e inguinais) drenam para seus respectivos linfonodos inguinais superficiais. A drenagem linfática do terceiro par de glândulas mamárias (abdominais craniais) é comum tanto aos linfonodos axilares quanto aos linfonodos inguinais, tornando a aspiração citológica de ambos os linfonodos quando neoplasias mamárias acometem este último par de glândulas mamárias (CHRISTENSEN, 1979).

Por sua vez, quando se pensa acerca da drenagem linfática na cadeia mamária de cães com neoplasias no tecido mamário, as informações são controversas no que diz respeito ao caminho da drenagem e as conexões linfáticas entre cada glândula mamária nos animais, uma vez que alterações anatômicas que ocorrem no microambiente regional (dada a produção de fatores linfangiogênicos) em detrimento da doença não permitem o estabelecimento de um padrão de drenagem (SORENMO et al., 2011; MATOS et al., 2012; SUAMI et al., 2013).

Dado que a drenagem linfática no tecido mamário pode sofrer alteração, recomenda-se a utilização de métodos que permitam avaliar com mais fidelidade o perfil drenante do local. Dentre as técnicas que permitem esta avaliação, destaca-se a técnica de biopsia do linfonodo sentinela, na qual se avalia (por meio do uso de corantes vitais) o primeiro linfonodo em uma cadeia linfática regional a receber a linfa de um tumor primário sendo, assim, o primeiro a conter um novo foco neoplásico. Com isso, é possível caracterizar com precisão o estado nodal (KELLEY et al., 2004; SAKORAFAS & PEROS, 2007). Utilizada desde a década de 1990 em estudos realizados em mulheres com câncer de mama

(Krag et al., 1993), a técnica apresenta resultados promissores também nos animais (Aquino et al., 2012).

Sugere-se que todos os cães com neoplasias mamárias malignas sejam submetidos à realização de radiografias torácicas em três direções, uma vez que a radiografia ainda é o método diagnóstico padrão na avaliação de pacientes veterinários no que diz respeito à análise da presença ou ausência de metástases pulmonares. A radiografia convencional permite detectar lesões que variam em um mínimo de seis a oito milímetros de diâmetro (Misdorp, 2002; Lana et al., 2013).

A detecção precoce e o tratamento da doença metastática podem exercer impacto na resposta e resolução da doença nos pacientes humanos e a tomografia computadorizada é o método padrão de avaliação dos pulmões de pacientes humanos na busca por metástases (Glasspool & Evans, 2000). É importante realizar o diagnóstico por imagem do tórax de cães com neoplasias mamárias malignas, pois metástases à distância estão associadas com um pior prognóstico. Os pulmões compreendem o sítio mais comum de ocorrência de focos secundários metastáticos das neoplasias mamárias caninas, porém a avaliação de outros locais como o abdômen também pode ser necessária dependendo dos sinais clínicos apresentados pelos pacientes. Nestes casos, a ultrassonografia ou a radiografia abdominal podem ser de auxílio na detecção de metástases abdominais (Misdorp, 2002; Lana et al., 2013).

1.1.3 Oncologia comparada

De modo geral, o câncer de ocorrência natural possui a mesma essência da doença nos seres humanos, de uma maneira que poucas outras espécies poderiam se assemelhar. O câncer com ocorrência natural nos cães ocorre em um contexto de imunidade adequada, sendo caracterizado por um crescimento ao longo de períodos de tempo em um hospedeiro e um microambiente singênicos, desenvolvendo recorrência e metástases para sítios anatômicos relevantes. Estes animais compartilham muitas características clínicas, biológicas e epidemiológicas com cânceres de seres humanos, incluindo características histológicas, morfológicas, genéticas, comportamentais e de resposta ao tratamento (Vail & Macewen, 2000; Khanna et al., 2006; Paoloni & Khanna, 2007; Paoloni & Khanna, 2008). Ademais, a disponibilização da sequência do genoma canino completo demonstrando uma homologia acentuada e semelhança estreita com o genoma humano, considerada, inclusive, mais estreita do que a relação do genoma humano com o genoma dos roedores, evidencia a relevância da utilização dos cânceres de ocorrência natural nos cães como

ferramentas para pesquisa translacional em câncer (KIRKNESS et al., 2003; LINDBLAD-TOH et al., 2005).

Os tumores mamários ocorrem potencialmente em todas as espécies de mamíferos, sendo que a comparação da doença nos animais com o câncer de mama na mulher pode aumentar o nosso entendimento acerca dos mecanismos moleculares e sobre os fatores de risco e perfis genômicos relevantes para este tipo de câncer. Na espécie canina, ao representarem a principal neoplasia das fêmeas (MISDORP, 2002; WITHROW et al., 2013), os tumores mamários assumem um aspecto semelhante ao câncer de mama das mulheres, nas quais representa a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer (após o câncer de pulmão) e é o câncer mais comum neste sexo, excluindo-se cânceres de pele do tipo não-melanoma (SIEGEL et al., 2014).

Mais importante do que as similaridades histológicas, as alterações moleculares relacionadas ao câncer nos cães e nos seres humanos são bastante semelhantes. Muitos oncogenes e supressores tumorais determinados como importantes para cânceres específicos dos seres humanos foram demonstrados como contribuintes na carcinogênese canina (HAGA et al., 2001; WITHROW et al., 2013).

1.1.4 Biomarcadores do câncer

Com o aumento na expectativa de vida dos animais, a prevalência da maioria dos cânceres provavelmente aumentará progressivamente. A detecção precoce das várias formas de câncer antes que os mesmos se disseminem pelo organismo do paciente e se torne, por vezes, incurável, torna importante o incentivo para que os oncologistas, assim como os oncologistas veterinários e pesquisadores, venham a se preocupar com um diagnóstico em fase inicial do desenvolvimento da doença (ETZIONI et al., 2003). Um dos principais métodos para o diagnóstico precoce do câncer, para auxiliar na determinação de seu prognóstico e para prever a resposta terapêutica é a utilização de biomarcadores séricos e teciduais. Os biomarcadores do câncer podem ser o DNA, o RNAm, proteínas, metabólitos ou eventos celulares tais como a apoptose, a angiogênese e a proliferação (HAYES et al., 1996).

Os biomarcadores podem ser produzidos tanto pelas células neoplásicas como por outros tecidos em resposta à presença de uma neoplasia ou de acordo com outras condições, tais como a inflamação. Tais marcadores podem ser utilizados para triar a população geral, para o diagnóstico diferencial de pacientes sintomáticos e para o estadiamento clínico do câncer. Ademais, estes marcadores podem ser utilizados para estimar o volume tumoral, para avaliar a resposta ao tratamento, para verificar a recorrência da doença ou como um indicador

prognóstico da progressão da doença (HANAHAHAN & WEINBERG, 2000; HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

Diversos tipos de biomarcadores existem, incluindo hormônios, enzimas, mutações gênicas, amplificações e translocações e mudanças no perfil genômico dos pacientes. Independentemente do tipo de marcador, a utilização de um biomarcador para o câncer depende da confirmação da melhora no desfecho da doença do paciente quando o mesmo é avaliado, tal como na sobrevida ou no aumento da qualidade de vida do paciente (HAYES et al., 1996). Apesar das múltiplas indicações, somente alguns marcadores são utilizados rotineiramente na avaliação dos pacientes e somente para um número limitado de tipos de câncer e condições clínicas. Na maioria dos casos, os biomarcadores são avaliados em conjunto com os resultados de imagem, histologia e achados clinicopatológicos antes que uma decisão clínica seja tomada (HAYES et al., 1996).

O primeiro biomarcador relatado para o câncer foi a cadeia leve de imunoglobulina na urina, a qual foi identificada em 75% dos pacientes com mieloma em um estudo do ano de 1848 (JONES, 1848). O teste para este marcador ainda é empregado na prática médica, porém com técnicas modernas. Entretanto, a era moderna da avaliação dos biomarcadores do câncer somente se deu a partir da década de 1960, com a descoberta da fetoproteína- α (ABELEV et al., 1963) e do antígeno carcinoembriogênico (CEA) (GOLD & FREEDMAN, 1965) após a introdução de técnicas imunológicas como o radioimunoensaio. Na década de 1980, com o desenvolvimento da tecnologia do hibridoma, foram desenvolvidos biomarcadores para os carcinomas ovarianos – o antígeno do carboidrato 125 (CA 125) (BAST et al., 1981). Ainda na década de 1980 foi caracterizado o antígeno específico da próstata (PSA) (PAPSIDERO et al., 1980), o qual é considerado até os dias atuais como um dos melhores biomarcadores de câncer.

O desenvolvimento de biomarcadores depende de cinco fases conceituais: estudos exploratórios pré-clínicos, ensaios clínicos e de validação, estudos retrospectivos longitudinais, triagem prospectiva e ensaios randomizados controlados (WHITEAKER et al., 2007). Infelizmente, os estudos atuais sobre biomarcadores tumorais são extremamente variáveis, não somente no que diz respeito aos métodos de avaliação empregados, mas também em relação às características dos pacientes. Heterogeneidades intratumoral e interpacientes constituem importantes fatores de confusão. Novos testes para biomarcadores devem, portanto, ser validados rigorosamente de modo que seu valor clínico possa ser demonstrado.

1.1.4.1 Biomarcadores do câncer de mama

Atualmente existem diversos fatores clínicos, moleculares e histopatológicos validados os quais são rotineiramente utilizados como marcadores preditivos para o câncer de mama. Estes incluem a idade do paciente, a graduação do tumor, o tamanho da neoplasia, o estado nodal e a presença de metástase, o histotipo e o estado de receptor hormonal (RE e receptor de progesterona [RP]) (GIANCOTTI, 2006). Mais recentemente, o estado do receptor de fator de crescimento epidérmico 2 (HER2) e a invasão peritumoral também foram incluídos como marcadores de rotina nas mulheres com câncer de mama (COLLEONI et al., 2007; CURIGLIANO et al., 2009).

Historicamente, os cânceres de mama eram divididos em positivos ou negativos para receptores hormonais. Isto auxiliou na orientação do tratamento de pacientes quanto ao uso de terapias endócrinas diretamente ou indiretamente com alvo no receptor hormonal, tais como modulares seletivos de receptor de estrógeno como, por exemplo, o tamoxifeno e os inibidores da aromatase (HOWELL et al., 2000). A ampla utilização destes agentes na terapia adjuvante prolonga significativamente as sobrevidas global e livre de doença e reduz a incidência de câncer de mama contralateral (EBCTCG, 1998; BAUM et al., 2003). Apesar disso, até metade dos cânceres positivos para receptores hormonais não respondem à terapia endócrina na apresentação inicial (resistência intrínseca) ou desenvolvem resistência ao longo do tempo (resistência adquirida) (OSBORNE, 1998). Um desafio importante na prática médica é a separação dos pacientes entre grupos que se beneficiarão ou não da terapia adjuvante sistêmica.

Ao longo da última década, a análise da expressão gênica utilizando o agrupamento categorizado de cânceres de mama dentre cinco grupos principais ou subtipos: luminal A, luminal B, superexpresso para HER2, basal e normal, os quais são determinados de acordo com sua semelhança na expressão em relação ao tecido normal e tumores benignos (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2004). Estes subtipos diferem em relação ao desfecho, da sobrevida livre de doença e global, prognóstico, resposta ao tratamento e raça ou etnia (VAN'T VEER et al., 2002; SOTIRIOU et al., 2003; SORLIE, 2004; WANG et al., 2005; CAREY et al., 2006). Isto sugere que o câncer de mama não é uma entidade única, mas sim uma coleção de doenças heterogêneas manifestadas pelas diferenças em nível molecular, histopatológico e clínico, possibilitando uma origem em diferentes vias celulares ou linhagens de células, tais como células-tronco. Entretanto, a determinação do perfil gênico é oneroso financeiramente e não prontamente disponível em muitos lugares. Como resultado, diversos estudos investigaram o papel dos painéis de marcadores imunoistoquímicos que poderiam ser

Breno Souza Salgado

rotineiramente utilizados para classificar os cânceres de mama em subtipos semelhantes aqueles previamente definidos utilizando a análise de expressão gênica (TANG et al., 2008). Para tal, muitos pesquisadores utilizam painéis de imunoexpressão baseados no RE, RP e HER2 (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação do subtipo de câncer de mama

Subtipo	Estado de RE	Estado de RP	Estado de HER2
Luminal A	Positivo	e/ou positivo	Negativo
Luminal B	Positivo	e/ou positivo	Positivo
Basal	Negativo	Negativo	Negativo
Superexpresso para HER2	Negativo	Negativo	Positivo

RE, receptor de estrógeno; *RP*, receptor de progesterona; *HER2*, receptor de fator de crescimento epidérmico

Os resultados para as neoplasias basais são denominadas “triplo negativas”, sendo associadas com um fenótipo mais agressivo. Este subtipo foi originalmente identificado entre 2% e 18% de todos os cânceres de mama que expressavam citoqueratinas de alto peso molecular em suas células mioepiteliais (MOLL et al., 1982; MOLL et al., 1983), momento este no qual foi percebido que as neoplasias eram negativas tanto para RE quanto para RP e HER2. O achado clínico mais significativo deste subtipo é a de que ele apresenta sobrevida livre de doença e global menores do que outros subtipos (SORLIE et al., 2001).

Visto que a determinação do perfil de expressão gênico é impraticável na medicina veterinária atualmente, um painel semelhante foi aplicado nas neoplasias mamárias de cadela, permitindo a verificação de um perfil semelhante nas neoplasias mamárias das cadelas (GAMA et al., 2008b). No caso da aplicação de terapias direcionadas aos subtipos específicos nas cadelas, espera-se, baseado nestes resultados, que as respostas sejam semelhantes.

1.2 TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA CANINO

1.2.1 Tratamento convencional

A mastectomia cirúrgica é o tratamento de eleição para tumores mamários caninos, sendo considerado por muitos a ferramenta mais efetiva para o controle regional da doença (SORENMO, 2003), exceto nos casos de carcinoma inflamatório (MISDORP et al., 1999). Consequentemente, a remoção cirúrgica completa de tumores localizados e que não apresentam doença metastática é o procedimento terapêutico com maior probabilidade de

cura. Esta modalidade terapêutica pode ser curativa nos cães com estágio I da doença e para tumores pequenos (< 1 cm) quando não são invasivos e são bem diferenciados à avaliação histológica (SORENMO, 2003).

A extensão das incisões depende especialmente do tamanho e da localização das lesões. A lumpectomia deve ser considerada para a remoção de lesões isoladas superficiais não-aderidas e pequenas de, no máximo, 0,5 cm de diâmetro. Lesões maiores tornam necessária a remoção da glândula como um todo. A mastectomia simples é indicada para lesões de até três centímetros de diâmetro as quais acometem somente uma glândula, ao passo que a mastectomia regional ou ressecção em bloco é indicada para a remoção de conexões linfáticas de glândulas que apresentam lesões maiores do que 3 cm de diâmetro (BRODEY et al., 1983; LANA et al., 2013). Por sua vez, a mastectomia radical consiste na remoção de uma das cadeias mamárias quando lesões maiores do que três centímetros de diâmetro acometem a glândula abdominal cranial. As mastectomias regional e radical também podem ser realizadas quando os pacientes apresentam lesões múltiplas de modo a gerar uma única ferida cirúrgica no procedimento (LANA et al., 2013).

Após a remoção cirúrgica, as características histológicas serão avaliadas e as cadelas com tumores pouco diferenciados histologicamente apresentam uma maior chance de desenvolvimento de metástases e podem se beneficiar de tratamentos adicionais (SORENMO, 2003).

1.2.2 Quimioterapia antineoplásica

Mulheres diagnosticadas com câncer de mama são comumente submetidas a tratamento adjuvante com quimioterápicos de modo a prevenir ou retardar o desenvolvimento de focos metastáticos nos casos mais agressivos. Apesar da terapia adjuvante poder ser utilizada na rotina da oncologia veterinária, as informações disponíveis acerca da utilização e da eficácia da quimioterapia nas cadelas com tumores mamários são limitadas (MISDORP, 2002; LANA et al., 2013).

Muitos dos protocolos quimioterápicos utilizados na medicina veterinária se baseiam em protocolos utilizados para tratamentos de câncer nos seres humanos. Atualmente não existem agentes aprovados para o tratamento do câncer nos cães sendo que, basicamente, todos os quimioterápicos utilizados para tratar cães são medicamentos para uso humano. Entretanto, espera-se que novos fármacos antineoplásicos sejam submetidas para aprovação dos órgãos responsáveis nos próximos anos. A toxicidade dos quimioterápicos citotóxicos convencionais nos cães é semelhante, se não idêntica, aquela observada nos seres humanos.

Breno Souza Salgado

Entretanto, como o objetivo principal de maximizar a qualidade de vida do animal é importante para o proprietário, a dosagem do quimioterápico utilizado geralmente é menor do que aquela utilizada nos pacientes humanos (LANA et al., 2013).

Para o câncer de mama canino, os protocolos disponíveis na literatura são basicamente compostos por doxorrubicina, 5-fluorouracil, ciclofosfamida (SORENMO, 2003) ou a utilização de cisplatina ou carboplatina como quimioterápicos únicos (OGILVE & MOORE, 1996; MORRISON, 1998; LANA et al., 2013; LAVALLE et al., 2012).

1.2.3 Terapias alvo

As células neoplásicas necessitam de diversas cinases para direcionar seu ciclo celular, sua proliferação, invasão e angiogênese, dentre outros (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Tratamentos direcionados contra componentes de vias de sinalização específicas têm demonstrado resultados promissores na abordagem de tumores sólidos e cânceres hematológicos nos seres humanos. A relação entre um alvo específico no câncer, sua modulação com um inibidor e os benefícios clínicos também têm sido investigados nos cães com câncer. Ensaios clínicos avaliaram a segurança e a eficácia de inibidores de tirosina cinase em diferentes cânceres caninos, incluindo tumores mamários e com resultados bastante promissores especialmente para os mastocitomas cutâneos (LONDON et al., 2003; LONDON et al., 2009).

Na medicina, o desenvolvimento e especialmente a aprovação clínica de novos tratamentos para o câncer é lento, custoso e desgastante (DIMASI & GRABOWSKI, 2007). Um dos aspectos limitantes no desenvolvimento convencional de fármacos é que os modelos murinos de câncer não representam completamente os diferentes cânceres dos seres humanos, sendo diferentes devido aos seus longos períodos de latência, instabilidade genômica e heterogeneidade de células tumorais no seu microambiente (GORDON et al., 2009). Ademais, em contraste à medicina, as terapias alvo moleculares (dentre as quais a imunoterapia) para o câncer são limitadas na medicina veterinária.

Nos cânceres de mama das mulheres, a terapia alvo molecular para membros da família EGFR é comumente utilizada e especialmente direcionada para a proteína HER2 por meio da utilização do anticorpo monoclonal trastuzumab (Herceptin®, Genentech, South San Francisco, Estados Unidos) (GARNOCK-JONES et al., 2010). Uma vez que há uma homologia significativa para membros da família EGFR entre seres humanos e cães (SINGER et al., 2012), é de se esperar que possíveis terapias alvo molecular direcionados para essas proteínas sejam aplicáveis em cães com câncer. Isto é particularmente possível em um curto

prazo, especialmente pelo desenvolvimento de anticorpos específicos para utilização nos cães (SINGER et al., 2014).

1.2.3.1 Resistência à terapia alvo

A resistência à terapia alvo molecular tem sido o principal problema relacionado ao sucesso da aplicação destes agentes emergentes. A resistência pode ser um resultado de mutações pré-existentes/alterações no alvo dos fármacos (intrínseco) ou de mutações induzidas após um tratamento medicamentoso (adquirida). A resistência adquirida, ou seja, evidente nos pacientes que foram inicialmente responsivos e que foram tratados normalmente durante um ano até 18 meses, se tornou uma preocupação dos clínicos que tratam pacientes com terapias alvo, em particular no câncer de mama com o trastuzumab e com o lapatinib (LIU et al., 2009). Enquanto os mecanismos pelos quais a resistência ocorre não foram completamente caracterizados, muitos estudos forneceram hipóteses plausíveis.

Foi sugerida a hipótese de que a resistência adquirida pode ser evitada por meio da inibição simultânea das vias HER2 e de RE durante o tratamento. Ademais, foi estabelecido que a mutação na via de sinalização do fosfatidil inositol 3 cinase (PI3K) leva à resistência ao lapatinib in vitro. As mutações identificadas, a perda de função de PTEN ou uma mutação de ativação em PI3KCA levaram à resistência ao lapatinib. Entretanto, o fenótipo de resistência foi revertido após o tratamento com um inibidor de PI3K desenvolvido pela Novartis conhecido como BEZ235 (SERRA et al., 2008).

Através da avaliação de estudos, se tornou claro que existem diversos mecanismos pelos quais a resistência pode ser adquirida. Nos cães, em vista da pouca ou nenhuma utilização de terapia alvo, especialmente nos cânceres de mama da cadela, fazem com que seja difícil avaliar o fenômeno de resistência para tais agentes. Espera-se, entretanto, que com o avanço da oncologia veterinária seja possível caracterizar a existência e seu perfil também nas neoplasias caninas.

1.3 A FAMÍLIA EGFR

A família EGFR é composta por receptores tirosina cinase típicos implicados no câncer desde o final da década de 1970 e início da década de 1980, quando foi verificado que o vírus do tumor da eritroblastose aviária codificava para uma forma aberrante do receptor de fator de crescimento epidérmico (também conhecido como ErbB1, HER1 ou EGFR) (DOWNWARD et al., 1984b). Esta família é composta por quatro membros (HER1/EGFR, HER2, HER3 e HER4), os quais compartilham de uma estrutura geral semelhante composta

Breno Souza Salgado

por dois prolongamentos ricos em cisteína em seus ectodomínios e um domínio cinase margeado por uma cauda carboxiterminal com sítios de autofosforilação de tirosina (DOWNWARD et al., 1984a; RIEDEL et al., 1987) (Figura 1).

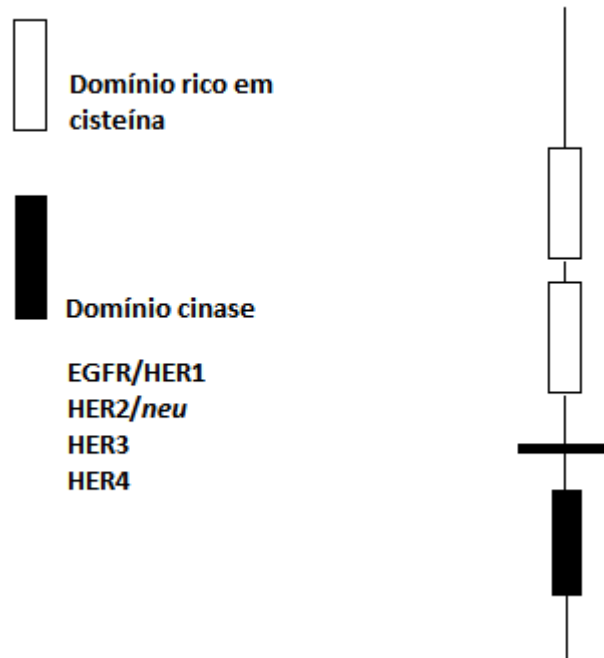


Figura 1. Representação esquemática da estrutura dos membros da família EGFR

Com poucas exceções (por exemplo, células hematopoiéticas), as proteínas da família EGFR são expressas tanto por células de origem mesodérmica quanto ectodérmica (YARDEN & SLIWKOSKI, 2001), participando do desenvolvimento de muitos sistemas no organismo. Pesquisas acerca da desregulação da família EGFR devido à superexpressão ou mutações demonstraram que suas interações promovem o câncer (HYNES & LANE, 2005). A ligação entre a família EGFR e o câncer foi observada durante estudos com EGFR, o primeiro membro da família descoberto, para o qual pesquisas iniciais estabeleceram que a ativação da cinase de EGFR pelo ligante de EGFR resulta em aumento da glicólise, da proliferação celular e em alterações no formato das células (CARPENTER & COHEN, 1979).

1.3.1 EGFR/HER1

Na fisiologia da célula normal humana EGFR/HER1 controla processos diferentes, tais como a organogênese renal, o balanço eletrolítico renal e a função cardíaca (MELENHORST et al., 2008; SCHREIER et al., 2012). Ademais, está relacionado com os processos de controle de sobrevivência celular, proliferação e adesão em diversos tipos

celulares. Quando a função do EGFR/HER1 se torna desregulada, estes processos são alterados, contribuindo para doenças tais como a doença renal policística e diversos tipos de câncer (HERBST, 2004). Recentemente o mecanismo de ativação de EGFR/HER1 foi revelado, permitindo concluir tanto sobre sua função normal e desregulada (ZHANG et al., 2006).

A interação entre EGFR e seus ligantes resulta na homo ou heterodimerização de EGFR seguida da autofosforilação do domínio tirosina cinase (MCCUNE & EARP, 1989). Os resíduos de tirosina fosforilados servem como pontos de ligação para o recrutamento de transdutores de sinal e ativadores de substratos intracelulares. A via das MAP cinases e a via PI3K e Akt são as principalmente associadas com os membros da família EGFR, incluindo EGFR/HER1 (ALROY & YARDEN, 1997; LIU et al., 1999; MUTHUSWAMY et al., 1999).

Apesar de alguns estudos associarem a superexpressão de EGFR/HER1 com um desfecho clínico ruim (TSUTSUI et al., 2002), o significado prognóstico deste componente no câncer de mama da mulher ainda é controverso (KLIJN et al., 1992; RAMPAUL et al., 2004). O interesse no EGFR/HER1 é alimentado pela disponibilidade de inibidores tirosina cinase específicos para EGFR, os quais foram testados em pacientes com diferentes cânceres (BASELGA & ARTEAGA, 2005). Este interesse também se estende à medicina veterinária em vista da possibilidade de utilização de inibidores específicos para EGFR/HER1 também nos cães (SINGER et al., 2014).

Em relação aos tumores mamários caninos, estudos relacionados à expressão de EGFR são escassos. Há um número limitado de relatos que demonstram a expressão de EGFR nas neoplasias mamárias (DONNAY et al., 1993, 1996; RUTTEMAN et al., 1994), por vezes associando-a com um comportamento agressivo (GAMA et al., 2009; CARVALHO et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2013; KIM et al., 2013; SILVA et al., 2014).

1.3.2 HER2/neu

HER2, também conhecido como erbB-2 e neu, é um gene que codifica para uma glicoproteína transmembrânica membro da família EGFR que trabalha como receptor tirosina cinase e medeia processos estimuladores de mitose, apoptose, neoangiogênese e diferenciação celular (MENARD et al., 2000). O gene que codifica para HER2 foi caracterizado como um oncogene chave no câncer de mama da mulher na década de 1980 (SCHECHTER et al., 1985; NATALI et al., 1990), com amplificação em 20-30% de todos os pacientes com câncer de mama, o que demonstra uma correlação com a superexpressão de HER2 e a redução na sobrevida dos pacientes (SLAMON et al., 1989). Em uma célula humana normal que expressa

HER2, existem duas cópias do gene e cerca de 50.000 cópias da proteína na superfície da célula. Entretanto, nos pacientes com amplificação deste gene e com superexpressão da proteína, o número de receptores na superfície das células pode aumentar para mais de um milhão (SLAMON et al., 1987; ROSS et al., 2003). Em razão disso, HER2 se tornou um alvo no tratamento do câncer de mama devido às suas propriedades de sinalização nos tumores de mama. Além disso, HER2 é classificado não somente como um fator prognóstico, mas também como um marcador preditivo para a resposta de diversos agentes terapêuticos nas mulheres com câncer de mama (ROSS & FLETCHER, 1998; TSONGALIS & RIED, 2001).

Nos cães, estudos demonstraram tumores benignos sem expressão de RNAm do gene em questão, ao passo que tumores malignos apresentaram níveis aumentados, sugerindo assim um papel na progressão maligna nestas neoplasias (AHERN et al., 1996). Apesar disso, estudos imunoistoquímicos subsequentes não foram consensuais, com as taxas de superexpressão em tumores variando de 17.6% até 48% (RUNGSIPIPAT et al., 1999; MARTIN DE LAS MULAS et al., 2003; GAMA et al., 2008b; SASSI et al., 2010; IM et al., 2013).

1.3.2.1 HER2 e receptores hormonais

Nas mulheres, aproximadamente 65% dos carcinomas mamários apresentam positividade para o RE, sendo frequentemente tratados por meio da utilização de tamoxifeno. Esta droga compete com o estrógeno pelo RE e, conseqüentemente, reprime a alta taxa de transição deste receptor. Subseqüentemente, células neoplásicas positivas para RE perdem seu fenótipo proliferativo, atingindo sucesso em aproximadamente 60% dos tumores positivos (JOHNSTON et al., 2003). Inibidores de aromatase e outros medicamentos anti-esteróides também são efetivos em tumores positivos para RE (BUZDAR & HORTOBAGYI, 1998), porém alguns casos podem apresentar resistência à terapia endócrina após certo período de tempo (JOHNSTON et al., 1997).

O mecanismo de resistência não é completamente compreendido, porém a interação entre RE/família EGFR está envolvida nos mecanismos de resistência nos pacientes com câncer de mama quando estes são submetidos à terapias endócrinas (NICHOLSON et al., 1999; SHOU et al., 2004; BENDER & NAHTA, 2008).

A dimerização entre os membros da família EGFR ativa diversas vias de sinalização e, como consequência, gera a fosforilação de diferentes cinases, gerando um esforço anti-apoptótico, estímulo para proliferação ou mesmo para a migração celular (DITTMAR et al., 2002; CITRI et al., 2003; HOLBRO et al., 2003). Ademais, esses efeitos

Breno Souza Salgado

podem também levar à ativação do RE ou mesmo de seus co-reguladores. Desta maneira, o RE pode gerar seus efeitos celulares, a dizer aumento do desenvolvimento tumoral e resistência à terapia endócrina nos pacientes com altos níveis de HER2 e RE (FONT DE MORA & BROWN, 2000; HONG & PRIVALSKI, 2000; SHOU et al., 2004).

O RE é expresso no núcleo, onde age como um regulador da transcrição de diversos genes. Sua estrutura é composta por um sítio de ligação, locais de ativação de transcrição e um local de ligação ao DNA de modo a cooperar com os promotores de genes alvo (PARKER, 1993; OSBORNE & FUQUA, 2000). A transcrição do gene alvo inclui o recrutamento de AIB1 (SRC3), um coativador do RE (McKENNA et al., 1999). Por outro lado, a estrutura do RE é altamente reagentes com o tamoxifeno, o qual estimula a aderência de co-repressores e, conseqüentemente, a expressão dos genes alvo se torna comprometida (SMITH et al., 1997; SHOU et al., 2004). Dependendo do tecido envolvido, o tamoxifeno pode apresentar papéis antagonistas ou agonistas, os quais podem indicar que em diferentes tecidos diferentes co-repressores e coativadores estão envolvidos. No caso das células apresentarem altos níveis de coativadores, tais como AIB1 ou SRC1, o tamoxifeno age como um agonista (SMITH et al., 1997).

O RE pode agir como um coativador de proteínas como a ciclina D1, envolvida no ciclo celular, receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFR), RP, fator de crescimento transformante- α e VEGF. Esta tática do RE nas células é denominada como mecanismo de RE mediado por genes (FRASOR et al., 2003). Ademais, o RE pode ser localizado no citoplasma de células mamárias neoplásicas, assim como em sua membrana, onde é capaz de reagir com Src, EGFR e HER2, em um evento denominado mecanismo de RE de mediação não-genômica (SONG et al., 2002; RAZANDI et al., 2003; SHOU et al., 2004).

Quando o tamoxifeno é aplicado em células neoplásicas que expressam altos níveis de RE, AIB1 e HER2, ele age como um agonista e resulta no desenvolvimento tumoral. Entretanto, caso o tumor apresente deficiência de estrógeno este desenvolvimento é comprometido. Conseqüentemente, os inibidores de aromatase – os quais restringem o estrógeno às células – aparentam possuir um efeito mais eficaz sobre células neoplásicas positivas para RE e HER2 (KATO et al., 1995; DOWSETT, 2003). Além disso, a interação entre RE e a família EGFR foi demonstrada na via de sinalização dependente de EGFR/HER2, a via das MAP cinases, onde a mesma encontra-se comprometida caso a concentração de RE diminuía significativamente, mas é potencializada no caso dos níveis de tamoxifeno ou estrógeno aumentarem (SHOU et al., 2005).

Inibidores de tirosina cinases (TKIs) tais como o gefitinib, quando utilizados em células neoplásicas que expressam RE, HER2 e AIB1 previnem a fosforilação de proteínas da família EGFR, alterando os efeitos mediados por estrógeno e tamoxifeno. Consequentemente, é possível concluir que a família EGFR é capaz de influenciar o estrógeno e o tamoxifeno devido à ocorrência de interações (SHOU et al., 2005).

1.3.3 HER3

O HER3 (ErbB3) é um receptor tirosina cinase o qual apresenta fraca atividade (GUY et al., 1994; KRAUSS et al., 1989). Ele forma com HER2 um complexo de alta afinidade para seu ligante natural, a heregulina (SLIWKOWSKI et al., 1994). HER3 está superexpresso em diversos cânceres nos seres humanos, porém não há evidência de amplificação gênica e dados sobre sua superexpressão são limitados. Entretanto, um estudo acerca das mutações encontradas na co-expressão de HER2 com EGFR ou HER3 nos carcinomas de células escamosas orais nos seres humanos demonstrou que elas são extremamente capazes de predizer o comportamento dos tumores (XIA et al., 1999). Consequentemente, a caracterização do papel de HER3 como um biomarcador prognóstico se torna mais importante, ao menos nos carcinomas de células escamosas humanos. De maneira semelhante, estudos com câncer de próstata sugerem a existência de um envolvimento parácrino de Neuregulina 1 e o heterodímero HER2/HER3 (LYNE et al., 1997). Nas cadelas, até o momento, são poucas as informações disponíveis na literatura acerca de HER3 (KIM et al., 2011), sendo os achados limitados e, até o momento, não apresentando relação com doenças malignas.

1.3.4 HER4

HER4, em comparação com os outros membros da família EGFR nos seres humanos, possui uma menor quantidade de dados disponíveis na literatura e, quando comparado com EGFR/HER1, HER2 e HER3, possui uma quantidade acentuada de informações conflitantes sobre seu comportamento, fazendo com que não seja facilmente relacionado com o desenvolvimento do câncer. HE4 possui tanto ligantes quanto atividade do tipo cinase, porém é produzida de maneira única em ao menos quatro isoformas de comprimento diferentes como uma consequência de splicing alternativo do RNAm (outros receptores podem apresentar formas parciais de sequências extracelulares as quais são secretadas como proteínas solúveis (JUNTILLA et al., 2000).

HER4 contém duas ou mais sequências extracelulares alternativas imediatamente antes da região transmembrânica a qual aparente ser tanto sensível (JMa) como insensível (JMb) à clivagem proteolítica. Isto pode gerar um fragmento extracelular solúvel e uma forma ativa catalítica ancorada à membrana. Este último fragmento é um substrato para clivagens posteriores em um local no interior da membrana celular que permite a liberação da proteína citoplasmática solúvel. Apesar de inesperado, isto aparenta se translocar para o núcleo da célula (SRINIVASAN et al., 1998) onde pode ativar a expressão gênica (ZHOU & CARPENTER, 2002). Esta região citoplasmática pode também ser de dois tipos, um (Cta) que contém um local que quando fosforilado pode recrutar um sinal da via PI3K, e outro que não apresenta este segmento de 16 aminoácidos (Ctb) e, conseqüentemente, não pode ativar esta via (JUNTILLA et al., 2000).

As evidências de que HER4 pode estimular o desenvolvimento tecidual foram demonstradas em diferentes sistemas, tais como no desenvolvimento da glândula mamária dos camundongos (JONES et al., 1999) ao induzir respostas de crescimento. Ademais, isto é reforçado pelo fato de estudos terem demonstrado que a expressão de uma ribozima citoplasmática que degrada seletivamente o RNAm do receptor suprime o crescimento celular (TANG et al., 1999; SARTOR et al., 2001).

O papel de HER4 na carcinogênese não foi totalmente esclarecido. Entretanto, estudos sugerem que existem três categorias de câncer: aqueles com superexpressão de HER4, os com ausência de superexpressão dos membros da família EGFR e aqueles com um ou mais dos outros receptores superexpressos (WITTON et al., 2003). Os mesmos estudos sugeriram que a superexpressão de HER4 possui o melhor prognóstico, levantando a questão sobre a necessidade de sua inibição e se tal fato não levaria à piora do prognóstico. Apesar disso, as informações sobre seu papel na carcinogênese ainda são conflitantes. Nos tumores mamários das cadelas, por sua vez, não existem informações acerca da expressão de HER4.

1.3.5 Família EGFR e dimerização

Uma interação ligante-ectodomínio encoraja a dimerização, a qual é caracterizada pelo contato tanto de duas proteínas diferentes da mesma família (heterodimerização) quanto duas moléculas idênticas (homodimerização). A natureza da conformação molecular de EGFR, HER3 e HER4 não permite que eles interajam com outros receptores tirosina cinase. O braço de dimerização permanece em uma conformação autoreprimida devido à ligação intramolecular dentro das proteínas situadas no domínio IV de seu ectodomínio. Entretanto, quando o ligante se conecta a uma dessas proteínas, o braço de dimerização localizado no

domínio II do ectodomínio se converte para uma conformação competente (GARETT et al., 2002), mesmo que uma interação com o ligante não seja suficiente para provocar uma reação (DAWSON et al., 2005).

A porção cinase localizada na cauda das moléculas da família EGFR (exceto por HER3) é ativada por meio de uma reação de transfosforilação. Duas porções, C e N, compõem esse domínio e cooperam para a geração de uma conformação ativa. A ativação da cinase ocorre quando a porção C da primeira cinase entra em contato com a porção N da segunda, a qual se torna alostericamente ativada (ZHANG et al., 2006). Múltiplas vias de sinalização intracelular são ativadas como resposta à dimerização da família EGFR, tais como a via da fosfolipase C (PLC), do transdutor de sinais e ativação de transcritos (STATs), MAP cinase (MAPK) e PI3K (MIACZYNSKA et al., 2004), sendo que as duas últimas são bem documentadas como relacionadas com a sobrevivência celular e proliferação (BUZDAR & HORTOBAGYI, 1998; NEVE et al., 2000).

Nas células neoplásicas, mutações nos domínios cinase de HER2 ativam a resistência a alguns inibidores de EGFR (WANG et al., 2006). A estrutura dos dímeros pode manipular as vias de regulação intracelulares, sendo que alguns arranjos estão presentes em carcinomas agressivos, tais como HER2/EGFR, EGFR/HER3 e HER2/HER3 (ALIMANDI et al., 1995; COHEN et al., 1996; GRAUSS-PORTA et al., 1997). Adicionalmente, a heterodimerização HER2/EGFR é relatada como presente na maioria dos carcinomas agressivos e de pior prognóstico (SUO et al., 2002), sendo que este dímero é mais estável do que outros (ROSKOSKI, 2004) que não incluem HER2. Após a reação biológica, o receptor ligante o qual está interagindo é quebrado por uma reação endocítica, inativando os receptores. As moléculas da família EGFR não-fosforilada são então tanto degradadas como recicladas para retornar para a membrana celular (ROSKOSKI, 2004). Estudos demonstraram que inibidores específicos de EGFR podem reduzir a sinalização de HER2 e o crescimento de células do câncer de mama que expressam altos níveis de HER2 (LENFERINK et al., 2000; MOASSER et al., 2001; MOULDER et al., 2001).

1.3.6 Sinalização para EGFR no câncer de mama e seus inibidores

Os componentes da via de sinalização do EGFR são evolutivamente antigos, assemelhando-se a sistemas simples de sinalização de fatores de crescimento, com o ligante se aderindo a um receptor monomérico do tipo tirosina cinase e ativando a função catalítica citoplasmática ao promover dimerização do receptor por meio da autofosforilação dos resíduos de tirosina (YARDEN & SLIWKOWSKI, 2001). Os últimos servem como locais de

Breno Souza Salgado

ancoragem para diversas proteínas e enzimas as quais iniciam simultaneamente diversas cascatas de sinalização para produzir uma resposta fisiológica. Entretanto, nos eucariotos mais evoluídos, esta via linear simples evolui para uma rede multilinear extremamente interativa na qual a coexpressão e a ativação de componentes permite respostas biológicas contexto-específicas ao longo da vida do indivíduo (YARDEN & SLIWKOWSKI, 2001).

A caracterização dos domínios intra e extracelulares dos membros da família EGFR fornece uma explicação satisfatória para o porque das interações horizontais serem cruciais na via de sinalização da família: HER3 representa um receptor significativamente mais fraco do que EGFR/HER1 nas reações de transfosforilação, fato este que aparenta se dar devido às diferenças entre os resíduos de aminoácidos no domínio cinase das duas proteínas os quais são conservados em outras famílias de receptores tirosina cinase (KRAUS et al., 1989), ao passo que HER2 aparente não possuir um ligante específico (KLAPPER et al., 1999). Consequentemente, quando isolados, tanto HER2 quanto HER3 não podem suportar a sinalização linear, fazendo com que para estes a formação de heterodímeros seja preferencialmente formada (TZA HAR et al., 1996; GRAUSS-PORTA et al., 1997).

No câncer de mama da mulher, para o qual a terapia alvo é bem fundamentada, atualmente é comum a utilização de inibidores direcionados para membros da família EGFR no tratamento dos tumores. Dentre os medicamentos utilizados, ganha destaque o trastuzumab (Herceptin, Genetech, São Francisco, Estados Unidos), anticorpos monoclonais humanizados que bloqueiam seletivamente a atuação das proteínas transmembrânicas desta família. Nos cães, em visto do seu custo elevado, ainda não é possível sua aplicação na prática clínica.

1.3.6.1 Trastuzumab

O trastuzumab é um anticorpo monoclonal produzido em camundongos aprovado pelo setor de Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos, sendo aplicável aos pacientes com superexpressão de HER2. Ele age no domínio IV de HER2, evitando a formação de heterodímeros e homodímeros. Este receptor não é um antígeno tumor-específico, porém quando expressado de 10 a 100 vezes mais do que no nível normal ele se torna um alvo para o trastuzumab. Este atributo é útil quando o alvo do tratamento são somente as células neoplásicas, fazendo com que a discriminação contribua para o sucesso nos tratamentos. A região constante do anticorpo murino não reage como um antígeno provocador da resposta imunitária nos seres humanos. Ademais, a utilização deste anticorpo nos seres humanos causaria um choque anafilático. Em vista disso, a região constante do

anticorpo foi humanizada, resultando em um anticorpo monoclonal quimérico anti-HER2 (WEINBERG, 2014).

A partir de ensaios clínicos, concluiu-se que o trastuzumab possui um efeito significativo nos pacientes diagnosticados com tumores que possuem expressão acentuada de HER2 de acordo com o HercepTest (Dako, Estados Unidos) (escore 3+) ou uma amplificação gênica (≥ 2 cópias) utilizando métodos de hibridação *in situ* fluorescente (HUDIS, 2007) ou cromogênica (DI PALMA et al., 2008). Entretanto, pacientes que demonstram uma expressão moderada (HercepTest 2+) não apresentarão resposta ao tratamento caso não haja amplificação gênica, necessitando ser realizada a confirmação do estado gênico por meio da hibridação *in situ* (HICKS & TUBBS, 2005).

1.3.6.2 Papel do Trastuzumab no tratamento do câncer de mama na mulher

O papel deste agente terapêutico pode ser separado em dois mecanismos principais, a dizer: o estímulo da estrutura imunitária que medeia a reação antineoplásica e a inibição das vias de regulação da família EGFR. Entretanto, o mecanismo de ação do trastuzumab não é completamente entendido, sendo sugerido que há a interiorização do complexo trastuzumab/HER2 e a degradação do respectivo receptor (RUBIN & YARDEN, 2001; MENARD et al., 2003). Outras pesquisas sugerem que a via PI3K/Akt é ativada pelo heterodímero HER2/HER3, o qual é afetado e leva a uma diminuição na ativação mediada pelo trastuzumab nas células com superexpressão de HER2 (LANE et al., 2000; LE et al., 2005).

Quando o trastuzumab é fornecido aos pacientes o sistema imunitário é ativado por meio do recrutamento de células responsáveis pela detecção de anticorpos e, como consequência, resulta em uma resposta citotóxica (WEINER & ADAMS, 2000). O anticorpo promove a apoptose de células neoplásicas por meio de citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC) (GENNARI et al., 2004), com o sistema imunitário respondendo a este estímulo do trastuzumab. Em vista disso, as células *Natural Killer* (NK) podem apresentar um papel chave na reação citotóxica. Estas células sanguíneas possuem um receptor Fc gama o qual interage com o domínio Fc do trastuzumab, resultando em lise mediada por NK (CLYNES et al., 2000). Entretanto, nos pacientes com câncer em estágio avançado e imunossuprimidos, os níveis de citotoxicidade são baixos (GOLDHIRSCH et al., 2005; NAHTA et al., 2006).

Uma modificação no trastuzumab mostrou resultados promissores *in vitro* ao aumentar a ADCC quando comparado com o anticorpo original. A transformação do

Breno Souza Salgado

trastuzumab normal consiste na eliminação da fucose (defucosilação) dos oligossacarídeos ligados à cadeia pesada de Asn297 (SUZUKI et al., 2007). Estes resultados foram posteriormente confirmados *in vivo* ao serem observados aumentos na média da sobrevida livre de doença em modelos pré-clínicos de câncer de mama superexpresso para HER2 (JUNTILLA et al., 2010). Além disso, a utilização de vacinas direcionadas ao HER2 também é uma estratégia promissora visto que pode diminuir respostas autoimunes funcionais, resultando em uma destruição tecidual limitada (BERNHARD et al., 2002).

Além dos mecanismos supracitados, outros podem participar da atuação do trastuzumab nos cânceres de mama. Foi demonstrado que a droga pode agir como um medicamento antiangiogênico (IZUMI et al., 2002). O desenvolvimento de novos vasos se torna comprometido e, conseqüentemente, a expansão dos tumores não progride de maneira adequada. Além disso, a evolução do processo metastático é comprometida devido à menor migração de células endoteliais. Quando combinada com agentes quimioterápicos, foram observados efeitos ainda maiores na prevenção da neoangiogênese (KLOS et al., 2003).

As células superexpressas para HER2 podem, ainda, ser destruídas por meio de apoptose mediada pelo trastuzumab. Isto pode ser conseguido devido à redução drástica nas vias de sinalização relacionadas ao processo mitogênico, incluindo PI3K e MAPK (SLIWKOWSKI et al., 1999; BASELGA et al., 2001). A morte de células sensibilizadas pelo trastuzumab ocorre ao longo da fase G1 do ciclo celular (SLIWKOWSKI et al., 1999) e os níveis de p27 também aumentam, inibindo o avanço no ciclo celular (LANE et al., 2001). A proteína p27 funcionará como um inibidor de ciclo funcional o qual interage com diferentes cinases ciclina-dependentes (CdK) as quais inibirão a finalização do ciclo celular (TOYOSHIMA & HUNTER, 1994).

1.3.6.3 Resistência ao Trastuzumab

Apesar de o trastuzumab ser utilizado para tratamento contra cânceres de mama superexpressos para HER2, mesmo quando metastáticos, a utilização deste medicamento já demonstrou ter sucesso em somente até 35% destes casos (VOGEL et al., 2002). Entretanto, quando combinado com a quimioterapia de primeira linha, o sucesso do tratamento pode chegar a 50%-84% (SLAMON et al., 2001; BURRIS et al., 2004). A eficácia do trastuzumab quando aplicado como agente único ou em combinação com a quimioterapia pode ser temporária devido ao desenvolvimento de resistência. Os resultados os quais não apresentam sucesso podem apresentar falha no bloqueio da dimerização quando altos níveis de ligantes estão presentes (MOTOYAMA et al., 2002).

1.4 INTRODUÇÃO À SUPERFAMÍLIA ABC

1.4.1 Visão geral sobre os transportadores ABC

Esta superfamília é um dos maiores grupos de proteínas transmembrânicas celulares, sendo composta por mais de 40 membros nos seres humanos e presentes em todas as espécies vivas, funcionando nelas como receptores, canais e transportadores (UEDA et al., 1999). Uma característica comum das proteínas deste grupo é o domínio específico ABC (do inglês *ATP-Binding Cassette*, ligador de ATP) o qual é responsável pela ligação do ATP e sua hidrólise (UEDA et al., 1999).

Para a função receptora e de canal, a ligação e/ou hidrólise do ATP possui uma função reguladora, enquanto no caso do funcionamento como transportador a hidrólise do ATP é necessária para fornecer energia para o processo de transporte (Figura 2). Dentro do grupo de proteína ABC estão os transportadores multidrogas, nomeados assim devido à extrusão realizada por eles de uma variedade de componentes estruturalmente diferentes a partir das células. Estes frequentemente estão superexpressos no câncer e conferem resistência cruzada para diversos componentes tóxicos (GOTTESMAN et al., 1996; HIGGINS et al., 1992).

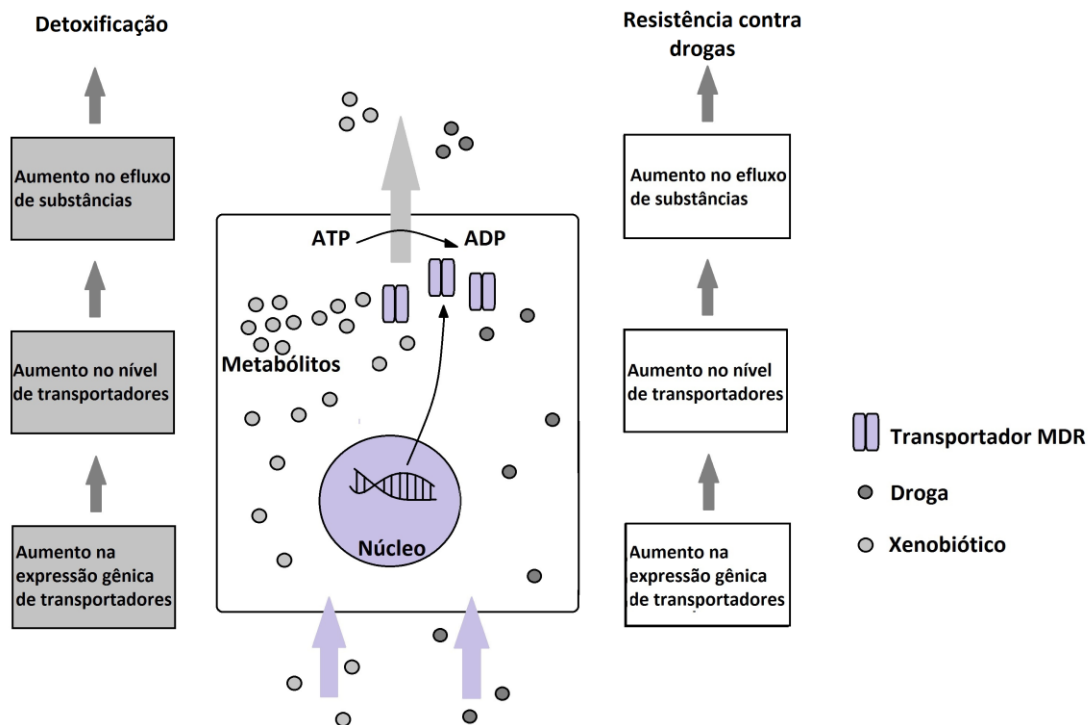


Figura 2. Representação esquemática do funcionamento dos transportadores ABC na célula. Adaptado de FLETCHER et al., 2010.

1.4.2 Estrutura dos transportadores ABC

Para os transportadores ABC, a ligação e subsequente hidrólise do ATP nos seus domínios ligantes de nucleotídeos (DLN) são necessárias para fornecer energia para a passagem do substrato através das membranas. Dois motivos localizados distantes 100 a 200 aminoácidos de cada DLN, denominados Walker A e Walker B, são conservados entre todos os transportadores ABC, assim como em outros ligadoras de ATP (WALKER, 1982). O resíduo de lisina em Walker A está envolvido na ligação do h-fosfato do ATP enquanto o resíduo de ácido aspártico em Walker B interage com Mg^{2+} (HUNG et al., 1998; SHAROM, 2008). Existe, ainda, uma terceira sequência de aminoácidos conservada exclusiva dos transportadores ABC (ALSGGQ) localizada entre Walker A e B que é tida como um motivo de assinatura de ABC (ou motivo C). A função desta sequência ainda não é clara, apesar de ter sido relacionada com o reconhecimento, ligação e hidrólise do ATP (SHAROM, 2008).

Os transportadores ABC podem ser agrupados em exportadores e importadores, sendo que os importadores são subsequentemente divididos em duas classes (I e II), dependendo dos detalhes relacionados à sua estrutura e mecanismo de ação (HOLLAND & BLIGHT, 1999; REE et al., 2009; TER BEEK et al., 2014). Enquanto bactérias possuem tanto exportadores quanto importadores, células eucariotas, exceto algumas específicas, só possuem exportadores. A estrutura geral dos transportadores ABC é organizada em quatro unidades funcionais ou domínios, dois DLN e dois domínios transmembrânicos (DTM) (HOLLAND & BLIGHT, 1999). Nos eucariotos, a maioria dos transportadores ABC é constituída por um único polipeptídeo que contém todas as quatro unidades funcionais, com alguns membros “assimilados” a partir de meio-transportadores com metades idênticas (homodiméricas) ou diferentes (heterodiméricas). A figura 3 representa a estrutura geral da superfamília ABC (SHAROM, 2008).

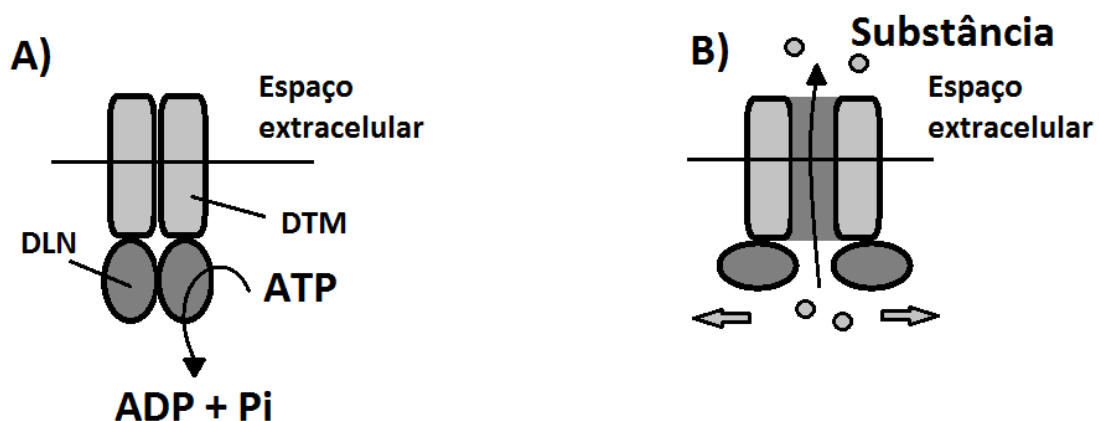


Figura 3. Representação esquemática da estrutura dos membros da superfamília ABC.

Breno Souza Salgado

1.4.3 Mecanismo de ação dos transportadores ABC

Com algumas exceções, os transportadores ABC devem bombear substratos contra o gradiente químico, um processo que requer a hidrólise do ATP como força impulsionadora. Sob condições fisiológicas, os transportadores ABC operam em direção única (importação ou exportação), apesar da bomba de efluxo de moléculas LmrA ter demonstrado ser reversível sob certas condições (BALAKRISHNAN et al., 2004), fato este que provavelmente significa que seus DTM operam como portões do tipo “vai e volta” os quais estão intimamente ligados ao ciclo catalítico dos DLN (SHAROM, 2008).

Para as células eucariotas e as proteínas exportadoras, sabe-se que diversos grupos de moléculas são exportados, incluindo colesterol e hormônios esteroides, lipídeos, derivados do ácido retinóico, ferro, sais biliares, nucleosídeos e peptídeos. A natureza essencial desse funcionamento é evidenciada pelo fato de que defeitos nos transportadores são observados em diversas doenças genômicas nos seres humanos (SHAROM, 2008).

1.4.4 Transportadores ABC e a resistência ao câncer

No fígado, placenta e barreira hematoencefálica, o grupo que inclui a glicoproteína-P/MDR1 (ABCB1), MRP1 (ABCC1) e BRCP (ABCG2) está diretamente ligado com a detoxificação de moléculas orgânicas hidrofóbicas (GOTTESMAN et al., 2002). Estes transportadores, quando expressos acentuadamente na membrana plasmática de células neoplásicas, podem resultar em falha na quimioterapia antineoplásica por meio da proteção destas células contra fármacos citotóxicos utilizados para combater a doença. Diversos esforços têm sido feitos no sentido de identificar inibidores seletivos para estes transportadores e, mesmo que diversos compostos foram identificados com este propósito, sua aplicabilidade na rotina clínica ainda não é possível devido aos efeitos colaterais significativos destes compostos (SHAROM et al., 2008).

1.4.4.1 Glicoproteína-P/MDR1/ABCG1

A associação específica entre os transportadores na membrana celular e o fenótipo de resistência à fármacos foi primeiramente observado em uma linhagem de células ovarianas de hamster chinês na década de 1970. Quando esta linhagem celular foi selecionada devido à resistência à colchicina ela também demonstrou ter resistência à daunomicina e à puomicina (JULIANO & LING, 1976). A proteína associada com este fenômeno, uma glicoproteína de membrana de 170 kDa presente na membrana apical de células epiteliais no trato intestinal, nos túbulos contorcidos proximais dos rins, na superfície canalicular dos hepatócitos, no

endotélio da barreira hematoencefálica e nas adrenais, foi purificada em 1979 e posteriormente denominada glicoproteína-P (P-gp, MDR1) (RIORDAN & LING, 1979). Seu papel fisiológico provavelmente está associado com a proteção do corpo contra xenobióticos. Ademais, é uma proteína transportadora de moléculas grandes hidrofóbicas, tanto sem carga quanto discretamente carregadas positivamente (BATES, 2003)

A glicoproteína-P, codificada pelo gene MDR1, é composta por 12 domínios transmembrânicos hidrofóbicos e dois domínios de ligação a nucleotídeos. Um domínio de ligação a nucleotídeos conecta dois domínios transmembrânicos com uma alça de ligação hidrofílica. Os domínios transmembrânicos são responsáveis por determinar as características dos substratos, ao passo que os domínios de ligação à nucleotídeos são responsáveis pela ligação ao e pela hidrólise do ATP, direcionando o transporte do substrato (HYDE et al., 1990).

Utilizando a energia fornecida pela hidrólise do ATP, a glicoproteína-P pode bombear um espectro variado de componentes, incluindo alcaloides da vinca, antraciclina, epipodofilotoxinas e taxanos (SZACAKS et al., 2006). Um estudo demonstrou que o RNAm e os níveis de glicoproteína-P estão aumentados em células K562 de leucemia mieloide crônica resistente ao fármaco imatinib (PENG et al., 2012), sendo que o acúmulo da droga estava diminuído. Estas informações sugerem que a superexpressão de glicoproteína-P pode ser ao menos um dos fatores que medeiam a resistência ao imatinib nas células neoplásicas na leucemia mieloide crônica. Ademais, sua presença está negativamente correlacionada com a eficácia do tratamento clínico em pacientes submetidos à terapia antineoplásica (BECK et al., 1996).

1.4.4.2 MRP1/ABCC1

Subsequentemente à descoberta da glicoproteína-P, estudos indicaram que as células cancerosas possuíam um fenótipo de resistência à múltiplas drogas não associado com a expressão de glicoproteína-P. Isto levou à descoberta de MRP1 (ABCC1), a qual primeiramente foi denominada MRP (COLE et al., 1992). MRP1 é uma glicoproteína de membrana de 190 kDa presente em muitos tecidos e localizada na membrana basolateral em células polarizadas. MRP1 transporta moléculas hidrofóbicas, medicamentos conjugados e também realiza a extrusão de vários ânions orgânicos (DEELEY & COLE, 2003). MRP1 possui dois domínios transmembrânicos e dois domínios citoplasmáticos de ligação a nucleotídeos (HIGGINS, 1992). A superexpressão de MDR1 e MRP1 tanto em neoplasias hematológicas como em tumores sólidos tem sido demonstrada, porém dados acerca de seu

Breno Souza Salgado

papel como fatores prognósticos do desfecho da quimioterapia ainda são controversos (LEONARD et al., 2003). MRP1 pode ainda ser caracterizada presença de um terceiro domínio NH2 na porção terminal da membrana celular (DTM0) na sua estrutura (BREVIG et al., 2003).

MRP1 é uma bomba aniônica lipofílica que confere resistência contra fármacos anticâncer. Ela está localizada na membrana plasmática de células intestinais, hepáticas e renais, assim como na barreira hematoencefálica e outras barreiras vitais. MRP1 possuem um papel importante ao se relacionar com a regulação da concentração citoplasmática de substâncias endógenas e exógenas (SODANI et al., 2012). Consequentemente, MRP1 pode influenciar o perfil farmacocinético de diversas fármacos.

Esta proteína está superexpressa em muitas linhagens celulares de câncer humano resistente à múltiplas drogas e confere resistência à diversos fármacos antineoplásicos, tal qual a glicoproteína-P (SZAKACS et al., 2006), conferindo resistência contra, por exemplo, antraciclinas, epidopofilotoxinas, alcaloides da vinca e camptotecinas (BREVIG et al., 2003).

1.4.4.3 MRP2/ABCC2/cMOAT

MRP2 é uma bomba aniônica lipofílica que confere resistência contra fármacos anticâncer (SODANI et al., 2012). Ela é uma proteína de que possui dois domínios transmembrânicos e dois domínios citoplasmáticos de ligação a nucleotídeos (HIGGINS, 1992), possuindo 49% de homologia com MRP1 (BUCHLER et al., 1996).

Ela é expressa na membrana apical (canalicular) de hepatócitos, mediando a exportação ativa de conjugados lipofílicos com glicuronato ou glutatona, tais como a associação entre alcaloides da vinca e glutatona (TANIGUCHI et al., 1996; TOH et al., 1999). MRP2 pode ainda ser caracterizada presença de DTM0 na sua estrutura (BREVIG et al., 2003), assim como MRP1.

Alterações genômicas em ABCC2, o gene que codifica para MRP2, causam defeitos na maturação e funcionamento da proteína (KEEPPLER et al., 1996; WADA et al., 1998; TOH et al., 1999), fazendo, inclusive, com que níveis substanciais de MRP2 sejam detectados em diferentes tumores nos seres humanos (SANDUSKY et al., 2002). Seus efeitos farmacológicos de MRP2 podem se assemelhar aqueles da glicoproteína-P e de MRP1, sendo que ela transporta ou confere resistência à fármacos anticâncer da família dos alcaloides da vinca (EVERS et al., 1998), metotrexato (HOOIJBERG et al., 1998), doxorrubicina (CUI et al., 1999) e cisplatina (TANIGUCHI et al., 1996), ao passo que resultados variados foram relatados para o etoposídeo (KOIKE et al., 1997).

Breno Souza Salgado

1.4.4.4 BCRP/ABCG2

ABCG2 é uma glicoproteína de membrana plasmática de 70 kDa mais recentemente descoberta que está localizada na membrana apical de células polarizadas (DIETRICH et al., 2003). Ela necessita de uma homodimerização para que sua função transportadora seja ativada (DOYLE & ROSS, 2003). ABCG2 está presente em diversos tecidos e células, incluindo células-tronco embrionárias, células do sinciciotrofoblasto placentário, células epiteliais no intestino delgado e cólon, canalículos hepáticos, epitélio da vesícula biliar, células-tronco adultas nos pulmões, endotélio das veias e capilares e nas barreiras hematoencefálica e hematotesticular (COORAY et al. 2002; MALIEPAARD et al., 2001; ZHOU et al., 2001).

Foi demonstrado que, fisiologicamente, ABCG2 protege o organismo de diferentes produtos da quebra dos alimentos (JONKER et al., 2002) ou metabólitos do heme (KRISHNAMURTHY et al., 2004). Estudos realizados em camundongos nocaute para *ABCG2* com utilização de inibidores indicaram que esta proteína possui uma importante função na prevenção da absorção de componentes tóxicos a partir do intestino, aumenta sua depuração hepatobiliar e protege as barreiras hematoencefálica e materno-fetal (JONKER et al., 2000; VAN HERWAARDEN et al., 2003; MIZUNO et al., 2004).

A presença de *ABCG2* foi detectada em diversas linhagens de células neoplásicas provenientes de diferentes tecidos, como pulmões, mama, cólon, ovário e estômago, bem como em fibrossarcomas e mielomas (ALLEN & SCHINKEL, 2002). A proteína confere resistência *in vitro* contra diferentes agentes citotóxicos utilizados em pacientes com câncer, como por exemplo, a mitoxantrona, o flavopiridol e o metotrexato (BRANGI et al., 1999; JONKER et al., 2000; MIYAKE et al., 1999; ROBEY et al., 2001; VOLK et al., 2000).

Estudos *in vivo* em pacientes submetidos a quimioterapia revelaram que *ABCG2* está superexpressa em diversos tumores, com a maioria dos casos tendo a superexpressão correlacionada com uma menor taxa de resposta à quimioterapia, aumento na resistência à quimioterápicos e menor sobrevida do paciente (KAWABATA et al., 2003; CANDEIL et al., 2004; FRIEDRICH et al., 2004). De maneira interessante, diferentes grupos observaram que *ABCG2* está superexpresso em somente algumas subpopulações de amostras de leucemia mieloide aguda (ABBOTT et al., 2002; SUVANNASANKHA et al., 2004). Tais subpopulações, as quais apresentam altos níveis de *ABCG2* e possuem um fenótipo de célula tronco, também foram observadas em outras neoplasias, incluindo o câncer de mama, câncer de pulmão de pequenas células e o glioblastoma (HIRSCHMANN-JAX et al., 2004).

1.4.5 Transportadores ABC e câncer de mama

Um possível papel dos transportadores ABC no curso clínico da resistência à múltiplas drogas no câncer de mama foi documentada para MRP1, porém não é conclusiva. Alguns autores observaram que a expressão de MRP1 no câncer de mama diminui com a perda da diferenciação histológica, sugerindo que a perda de MRP1 está associada com uma perda de diferenciação (BECK et al., 1998; FERRERO et al., 2000). Em contraste, uma associação de MRP1 com a progressão tumoral também foi sugerida (FILIPITS et al., 1996; NOOTER et al., 1997a; NOOTER et al., 1997b). Foi descrito por outros autores que MRP1 está presente em carcinomas mamários e tecido normal adjacente, não observando aumento de níveis de expressão de MRP1 em células tumorais. Com isso, não foi estabelecida uma correlação entre os níveis de RNAm de MRP1 e o grau de diferenciação histológica (DEXTER et al., 1998).

Uma correlação inversa entre a presença de MRP1 em amostras de câncer de mama e o acúmulo do agente lipofílico sestamibi marcado com Tecnécio-99m (KAO et al., 2001). Outros autores demonstraram um acúmulo reduzido de sestamibi marcado com Tecnécio-99m associado com a redução na sensibilidade à quimioterapia baseada em antraciclina. Apesar disto ser obviamente sugestivo do envolvimento de MRP1 na resistência à antraciclina, a evidência é indireta. O fator de MDR1/glicoproteína-P também poder reduzir o acúmulo de sestamibi e de ser frequentemente simultaneamente expresso com MRP1 complica interpretações adicionais destes resultados (LEONESSA & CLARKE, 2003).

Um estudo descreve a expressão do RNAm de ABCC2/MRP2 (e ABCC1/MRP1) em relação à resposta à quimioterapia no câncer de mama (BURGER et al., 2003), com os autores concluindo que MRP2 não está envolvido na resistência do câncer de mama às antraciclinas, enquanto MRP1 provavelmente está.

1.4.5.1 Transportadores ABC e neoplasias caninas

Na terapia veterinária a resistência à múltiplas drogas nos pacientes com tumores até o momento não recebeu tanta atenção apesar do incremento no uso de agentes citostáticos em cães com diferentes tipos de neoplasias (GINN, 1996; STEINGOLD et al., 1998; CULMSEE et al., 2004; PETTERINO et al., 2004; GASPAR et al., 2010). Por exemplo, em cães diagnosticados com linfoma não-Hodgkin, a expressão de glicoproteína-P ocorreu em poucos pacientes. Após uma recidiva a expressão de glicoproteína é maior e mais frequente do que em amostras pré-tratadas, sugerindo que possui papel na sobrevivência celular (LEE et al., 1996). Quimioterápicos que constituem substratos identificados para um ou mais
Breno Souza Salgado

transportadores ABC são amplamente utilizados na oncologia veterinária, tais como as antraciclinas, os alcaloides da vinca e os antifolatos (metotrexato). Apesar de diferenças entre a afinidade do substrato entre espécies ser limitado, estudos indicam uma diferente funcional importante interespecies. Em contraste aos seres humanos, MRP1 em cães, camundongos, ratos e bovinos falha em conferir resistência à doxorrubicina, apesar da funcionalidade semelhante para outros fármacos (STRIDE et al., 1997; MA et al., 2002; TAGUCHI et al., 2002; NUNOYA et al., 2003).

1.4.6 Transportadores ABC e a resistência à terapia alvo com inibidores tirosina cinase

Foi demonstrado que um dos possíveis mecanismos pelos quais células com translocações BCR-ABL se tornam resistentes aos efeitos do Gleevec é a superexpressão de MDR1 (MAHON et al., 2000). Foi documentado que células nessas condições da linhagem K562 suportaram até concentrações de 1M do Gleevec, enquanto quando houve adição de moduladores de MDR1 as concentrações necessárias para a morte celular foram menores (MAHON et al., 2003). Nas células que expressaram MDR1, maiores concentrações de Gleevec foram necessárias para diminuir a fosforilação da tirosina da cinase bcr-abl, indicando que o Gleevec não alcança seu alvo intracelular. Outros estudos confirmaram que MDR1 previne o efeito do Gleevec in células K562, enquanto o medicamento também aumentou o potencial citotóxico dos substratos de MDR1 (MUKAI et al., 2003).

Outros estudos avaliaram a interação do Iressa (ZD1839, Gefinitib) com MDR1 e MRP1 utilizando diversos ensaios in vitro (OZVEGY-LACZKA et al., 2004), observando que a droga provavelmente é um substrato transportador por MDR1, enquanto o composto somente inibia MRP1. É importante enfatizar que as concentrações de Iressa sob as quais as interações com o MDR1 foram demonstradas eram extremamente elevadas (1-10M). Em vista disso, não é provável que MDR1 cause resistência contra o Iressa durante o tratamento para o câncer. Apesar disso, MDR1 pode modular a absorção ou o metabolismo do Iressa quando este agente está presente em altas concentrações. Outros estudos (YANASE et al., 2004) dão suporte à essa hipótese ao demonstrar que MDR1, mas não MRP1, podem proteger células EGFR-dependentes da linhagem A431 contra a ação do Iressa, ao passo que o Iressa inibiu a resistência mediada por MDR1 ao etoposídeo e à vincristina.

CAPÍTULO II: INVESTIGAÇÃO

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a expressão dos membros das famílias ABC e EGFR nos carcinomas mamários caninos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial papel dos componentes estudados como biomarcadores prognósticos nos carcinomas mamários caninos;
- Avaliar a relação entre a expressão proteica e fatores clinicopatológicos de importância reconhecida na doença;
- Caracterizar o papel da coexpressão dos membros da família EGFR nos carcinomas mamários caninos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ASPECTOS ÉTICOS E ORIGEM DO MATERIAL EM ESTUDO

Foi conduzido um estudo prospectivo utilizando 43 amostras sequenciais de carcinomas mamários esporádicos de cadelas submetidas à cirurgia de mastectomia regional das mamas, realizadas no Hospital Escola de Medicina Veterinária da Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá – FEPI no período de dezembro de 2011 a novembro de 2012. Foi realizado exame físico, anamnese e obtenção do histórico das cadelas atendidas, as quais foram submetidas à exame citológico realizado por meio de aspiração com agulha fina e com confirmação do caráter maligno das neoplasias mamárias. Os casos foram selecionados mediante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da FMVZ/UNESP – Câmpus de Botucatu (Protocolo 73/2011 – CEUA), bem como do termo de consentimento livre e esclarecido dos proprietários dos animais em questão, que se comprometeram a fornecer informações sobre a sobrevida do animal após o procedimento cirúrgico e durante o curso deste estudo. Somente foram incluídos no estudo animais que apresentavam um tumor mamário isolado.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste estudo foram coletados os tumores mamários das cadelas submetidas à mastectomia radical unilateral. A sua situação de sobrevida dos animais foi realizada por meio

Breno Souza Salgado

de entrevistas realizadas via telefone com os proprietários num intervalo de seis em seis meses até um total de 18 meses pós-mastectomia para cada animal, sendo interrompida nos casos em que os animais vieram à óbito neste período (Figura 4).

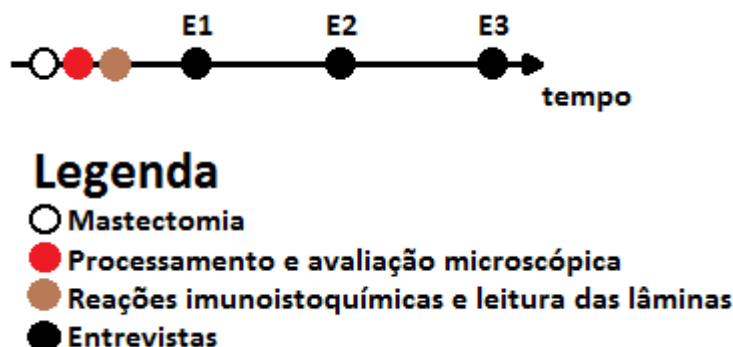


Figura 4. Eventos realizados durante a condução do estudo ao longo do tempo. *E1*: Entrevista seis meses após a mastectomia; *E2*: Entrevista doze meses após a mastectomia; *E3*: Entrevista dezoito meses após a mastectomia.

2.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os fragmentos coletados foram fixados em formalina a 10% tamponada, processados para inclusão em parafina e submetidos a microtomia para obtenção de cortes histológicos para coloração com hematoxilina e eosina no Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada da FMVZ/UNESP/Botucatu seguindo o protocolo padrão utilizado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – ICBAS, Universidade do Porto. Nesses cortes foram verificadas a qualidade da amostra e a classificação do histotipo da neoplasia. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz seguindo os critérios de classificação tumoral de acordo com a composição celular, adotados pela Organização Mundial de Saúde para os tumores mamários caninos (MISDORP et al., 1999). Foram avaliados, ainda, os linfonodos regionais de modo a caracterizar a presença ou não de metástases nodais, bem como a graduação histológica (ELSON & ELLIS, 1991) para verificar o grau de agressividade microscópico das neoplasias.

2.4 IMUNOISTOQUÍMICA

2.4.1 Técnica

Para a padronização de técnica imunoistoquímica realizou-se estudo piloto utilizando-se lâminas de microarranjos de tecido teste contendo amostras de carcinoma mamário de cadela as quais foram desparafinizadas e reidratadas. Em seguida, foi feita

recuperação antigênica por calor em câmara microprocessada de pressão (*Pascal Pressure Chamber*, Dako, EUA) durante 30 segundos a 125°C, utilizando tampão citrato de sódio pH 6,0. Após, o material foi incubado com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol, por 10 minutos em câmara escura, posteriormente sendo lavado com tampão Tris EDTA pH 7,4. Na sequência, as lâminas foram incubadas com solução de bloqueio de proteínas inespecíficas disponível em um kit para imunistoquímica (NovoLink, Novocastra Laboratories, Inglaterra) por 30 minutos, em temperatura ambiente e na sequência lavados com tampão Tris EDTA pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com anticorpos primários anti-EGFR, -c-erbB2, -HER3, -HER4, -P-glycoprotein, -MRP1 e -MRP2 (Tabela 4) diluídos em solução específica (IHC diluent solution, Novocastra Laboratories, Inglaterra) e aplicados sobre os cortes para incubação overnight a 4 °C. Para a amplificação de sinal utilizou-se sistema de detecção baseado em polímero (NovoLink, Novocastra Laboratories, Inglaterra) e para revelação a solução cromogênica de 3,3' diaminobenzidina (DAB) líquida (DAB chromogen, Dako, EUA). Os cortes foram contrainformados com hematoxilina de Harris, desidratados e as lâminas foram montadas com lâminulas utilizando meio de montagem específico (Permount, Fisher Scientific, EUA) para posterior leitura em microscópio de luz, seguindo o protocolo do Laboratório de Patologia e Imunologia Molecular do ICBAS, Universidade do Porto.

Tabela 4. Anticorpos primários utilizados para a coloração da superfamília ABC e da família EGFR.

Anticorpo	Fonte	Fabricante	Diluição	Tipo	Clone
EGFR	Camundongo	Novocastra Laboratories, Inglaterra	1:100	Monoclonal	EGFR 113
c-erbB2	Coelho	Dako, EUA	1:2000	Policlonal	-
HER3	Camundongo	Labvision, EUA	1:100	Monoclonal	2F12
HER4	Coelho	Labvision, EUA	1:300	Policlonal	-
P-glycoprotein	Camundongo	Dako, EUA	1:100	Monoclonal	C494
MRP1	Camundongo	Enzo Lifescience, EUA	1:200	Monoclonal	MRPm6
MRP2	Camundongo	Enzo LifeScience, EUA	1:200	Monoclonal	M ₂ III-6

EGFR, epidermal growth factor receptor; *EUA*, Estados Unidos da América; *MRP1*, multidrug resistance-associated protein 1; *MRP2*, multidrug resistance-associated protein 2

2.4.2 Avaliação microscópica

Para análise de P-glycoprotein, MRP1 e MRP2, foram considerados como positivas as neoplasias em que mais do que 10% das células neoplásicas apresentaram marcação citoplasmática e/ou membranar (USHIJIMA et al., 2007). Dos casos avaliados para EGFR, o sistema de pontuação *EGFR PharmDx* (Dako, Carpinteria, Estados Unidos) foi utilizado. A tabela 5 caracteriza os perfis de imunexpressão de acordo com este sistema.

Tabela 5. Classificação da intensidade de marcação de acordo com o *EGFR PharmDx*.

ESCORE	NÍVEL DE IMUNOEXPRESSÃO	PADRÃO DE MARCAÇÃO
0	Negativo	Ausência de coloração ou marcação de membrana das células
1+	Discretamente positivo; sem superexpressão	Não há marcação de membrana completa; marcação discretamente perceptível em >0% das células
2+	Moderadamente positivo	Marcação de membrana completa discreta a moderada em >0% das células
3+	Acentuadamente positivo	Marcação de membrana completa acentuada em >0% das células

Para HER2, foi utilizado o sistema de pontuação *HercepTest* (Dako, Carpinteria, Estados Unidos). A tabela 6 demonstra os perfis de imunexpressão de acordo com o *HercepTest*.

Tabela 6. Intensidade de marcação de acordo com o *HercepTest*.

ESCORE	RESULTADO	PADRÃO DE MARCAÇÃO
0	Negativo	Ausência de coloração ou marcação membranar <10% das células
1+	Discretamente positivo; sem amplificação	Não há marcação membranar completa; marcação discretamente perceptível em >10% das células
2+	Moderadamente positivo; possível amplificação	Marcação membranar completa discreta a moderada em >10% das células
3+	Acentuadamente positivo; existência de amplificação	Marcação membranar completa acentuada em >10% das células

Por sua vez, para HER3 e HER4 os resultados foram considerados como positivos quando mais do que 5% das células neoplásicas apresentaram reação citoplasmática e/ou membranar (ABD EL-REHIM et al., 2004). As lâminas foram avaliadas por dois observadores independentes às cegas para as características dos pacientes. Todos os casos

com resultados discrepantes foram discutidos em microscópio de duas cabeças/dupla observação de modo a se chegar a um consenso.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As associações entre a expressão protéica e as características clinicopatológicas foram determinadas por meio do teste exato de Fisher quando as variáveis apresentavam exatamente dois grupos (tabelas de contingência 2 x 2), tais como as metástases nodais (positivo ou negativo), ou por meio do teste do qui-quadrado para variáveis categóricas tais como a graduação histológica e o histotipo. Curvas de sobrevida foram estimadas utilizando-se o método de Kaplan-Meier, com nível de significância entre as sobrevidas caracterizada pelo teste *log rank*. Uma análise multivariada foi realizada por meio do modelo de regressão de riscos proporcionais de Cox. Todos os testes estatísticos foram pareados e os resultados foram considerados como significativos quando $P < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa computacional Prism Graphpad versão 5,0 para sistema operacional Microsoft Windows (San Diego, Estados Unidos).

CAPÍTULO III: RESULTADOS

1 AVALIAÇÃO CLÍNICA E PATOLÓGICA

A idade dos animais com tumor de mama variou de cinco a 14 anos, com média de $9,73 \pm 2,48$ anos. Foram acometidos animais sem raça definida (SRD) (18), Poodle/Caniche (5), Cocker Spaniel Inglês (3), Daschhund (4), Pinscher miniatura (4), Pastor alemão (3), Boxer (2), Labrador Retriever (3) e Rottweiler (1) (Figura 5).

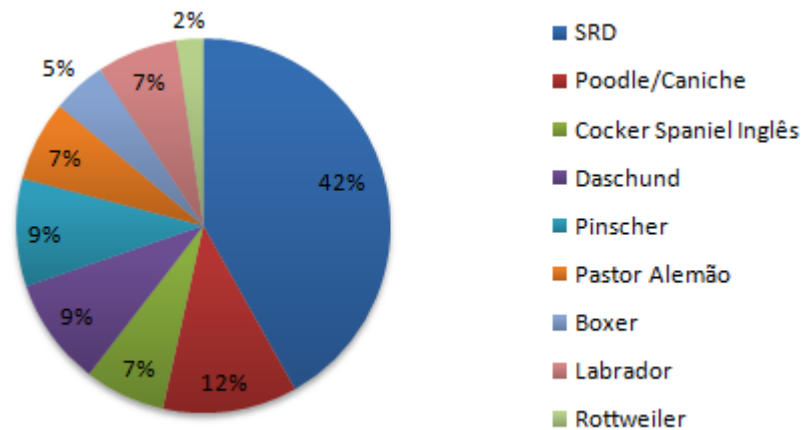


Figura 5. Distribuição percentual dos casos de tumores mamários por raça utilizados neste estudo.

Os histotipos diagnosticados correspondem a 21 carcinomas tubulopapilíferos, 11 carcinomas complexos, nove carcinomas em tumores mistos, um carcinoma in situ e um carcinoma sólido. Dez pacientes apresentaram metástases em linfonodos regionais e, do total, vinte e sete tumores foram classificados como de grau I, onze como de grau II e cinco como de grau III.

2 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

2.1 FAMÍLIA EGFR

A expressão de EGFR/HER1 se deu principalmente no citoplasma e na membrana das células, sendo detectada como superexpressa em 62,8% dos tumores, com 19,6% dos casos negativos (0) (Figura 6) e 17,6% dos casos com padrão 1+ (Figura 7). A expressão de HER2 foi observada em 55,8% dos casos, com 39,5% dos casos demonstrando padrão de superexpressão (2+ e 3+) (Figuras 8 e 9). Para HER3, a expressão foi principalmente citoplasmática, com 53,4% revelando resultado negativo. Por sua vez, a expressão de HER4 foi considerada positiva em 95,8% dos casos.

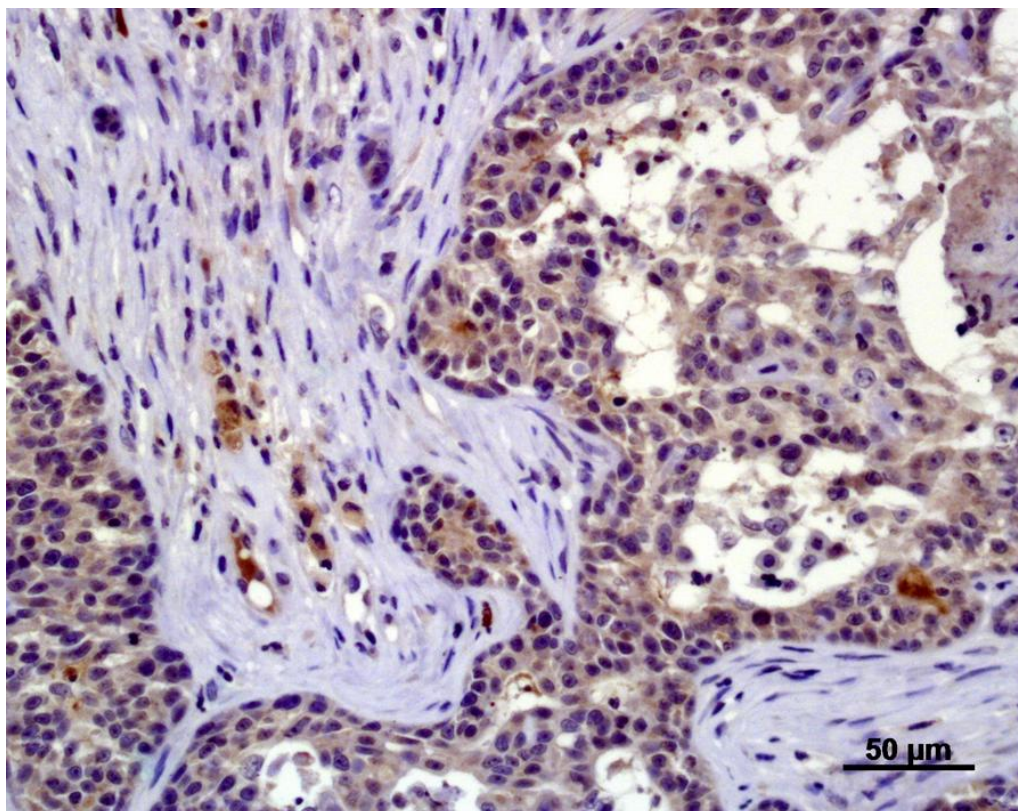


Figura 6. Imunoexpressão negativa para EGFR, com células sem evidências de marcação membranar. Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.

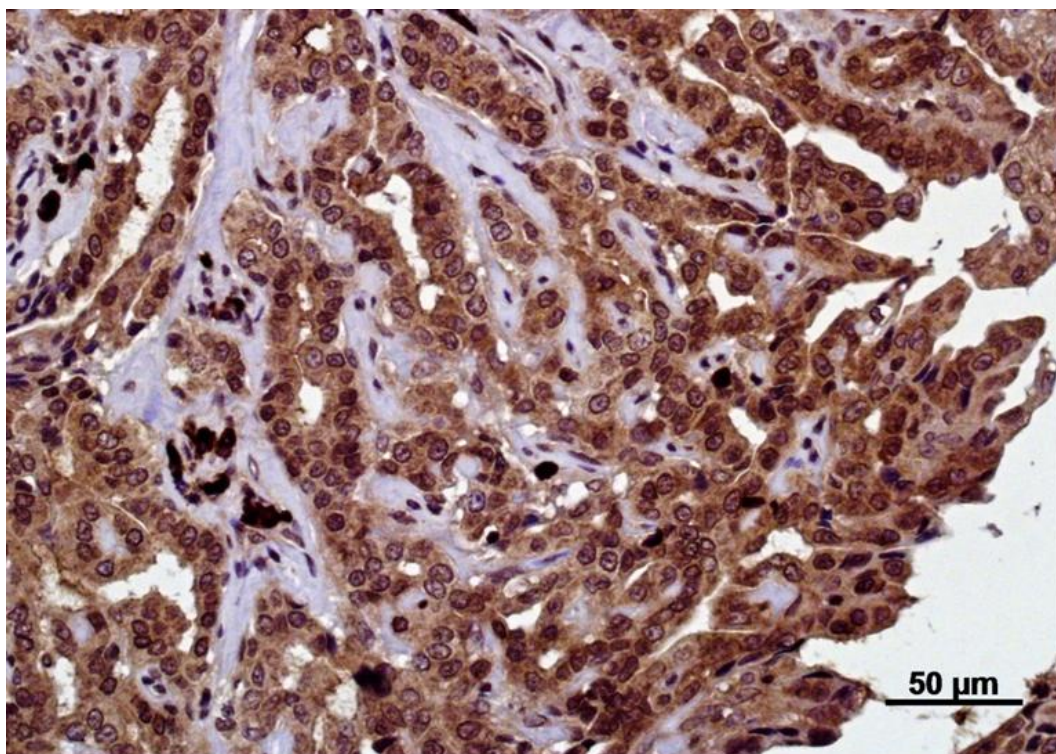


Figura 7. Expressão de EGFR com resultado 1+, com marcação membranar ocasional. Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.

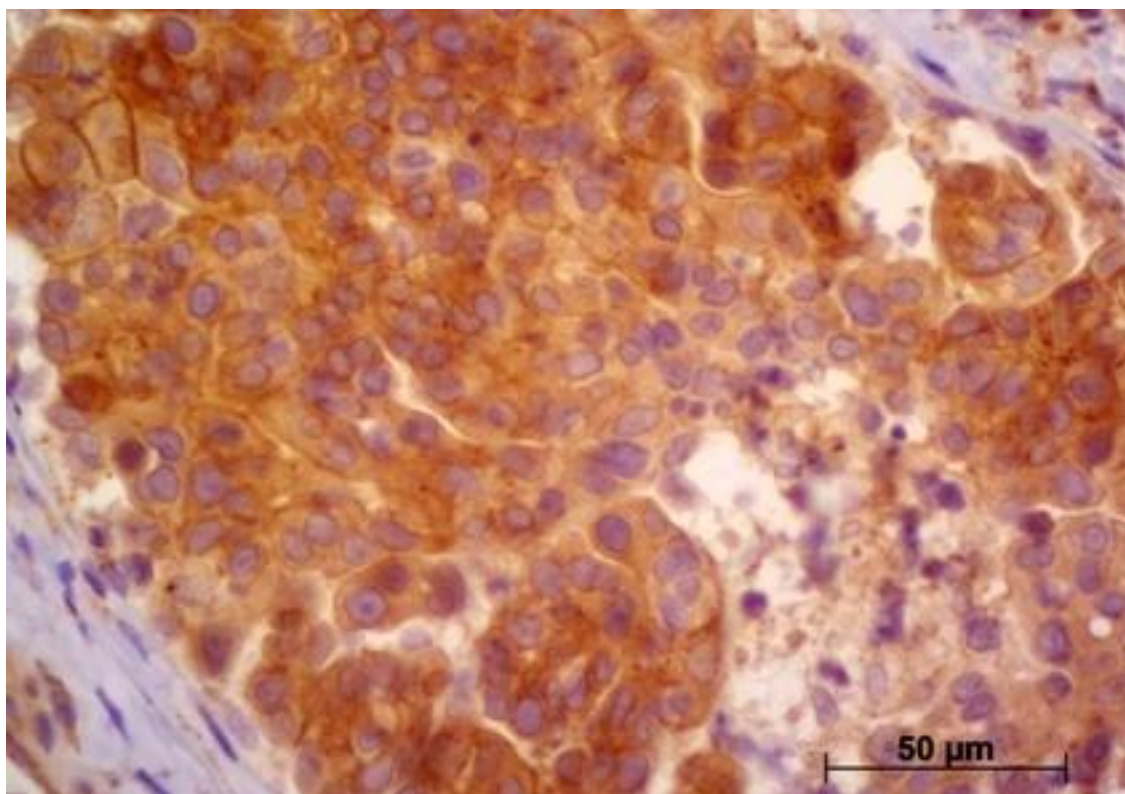


Figura 8. Expressão de HER2 com resultado 2+, com marcação membranar incompleta, porém acentuada. Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.

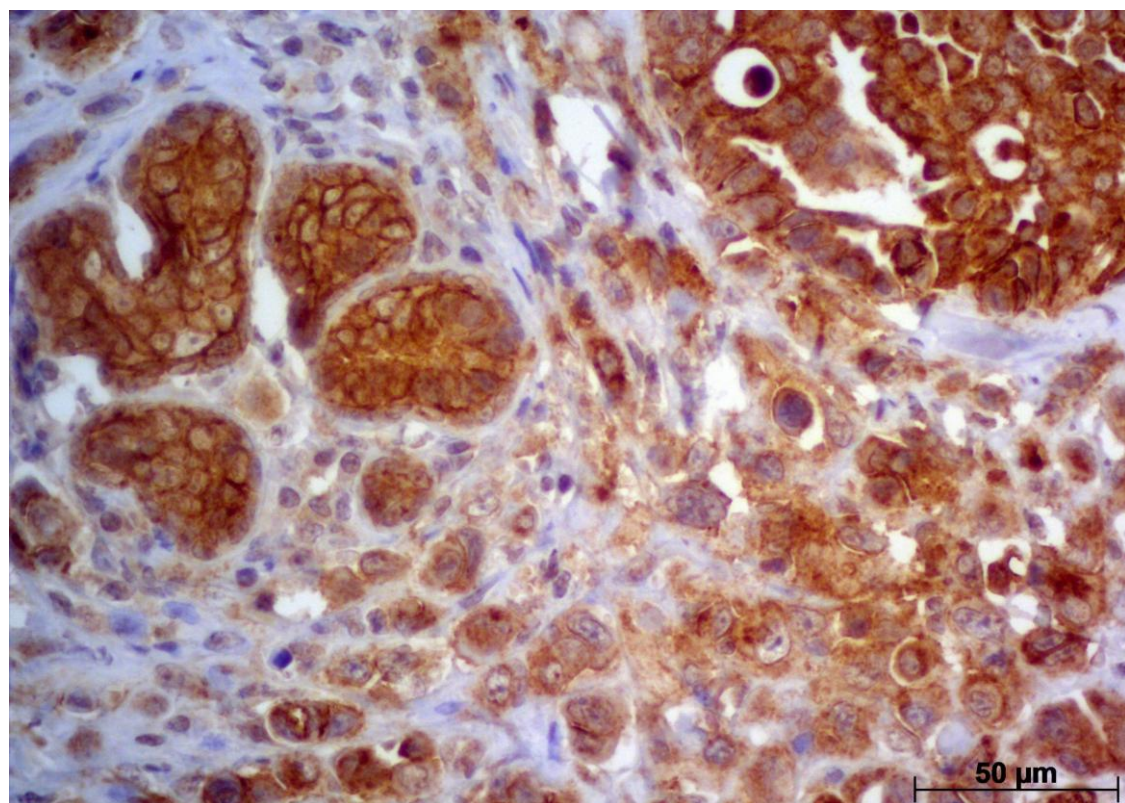


Figura 9. Expressão de HER2 com resultado 3+, com marcação membranar consistente e completa e marcação citoplasmática acentuada. Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.

Breno Souza Salgado

Uma associação significativa foi observada entre EGFR/HER1 e HER2 nos tumores avaliados, nos quais 46,4% das neoplasias positivas para EGFR também eram positivas para HER2 ($P = 0,0303$). Ademais, a expressão de HER4 demonstrou estar associada com a de outros membros da família EGFR (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de P de acordo com a expressão simultânea de EGFR/HER1, HER2, HER3 e HER4

Variável	EGFR	HER2	HER3	HER4
EGFR				
HER2	0,0303*			
HER3	0,1280	0,6634		
HER4	0,0007*	<0,0001*	<0,0001*	

* situações com relação estatística significativa;

EGFR, epidermal growth factor receptor

Somente nove casos (oito HER4-positivos e um HER3-positivo) não revelaram expressão simultânea de ao menos dois membros da família EGFR. Todos os outros casos revelaram expressão de ao menos dois membros da família EGFR ao mesmo tempo, com mais da metade dos casos (64,7%) expressando positivamente três ou quatro membros ao mesmo tempo. Quando somente dois membros eram expressos, a coexpressão EGFR/HER1 e HER4 foi a mais comum (17,7%). Não houve casos de ausência de expressão completa da família EGFR. A frequência dos 34 casos que demonstraram coexpressão é demonstrada na figura 10.

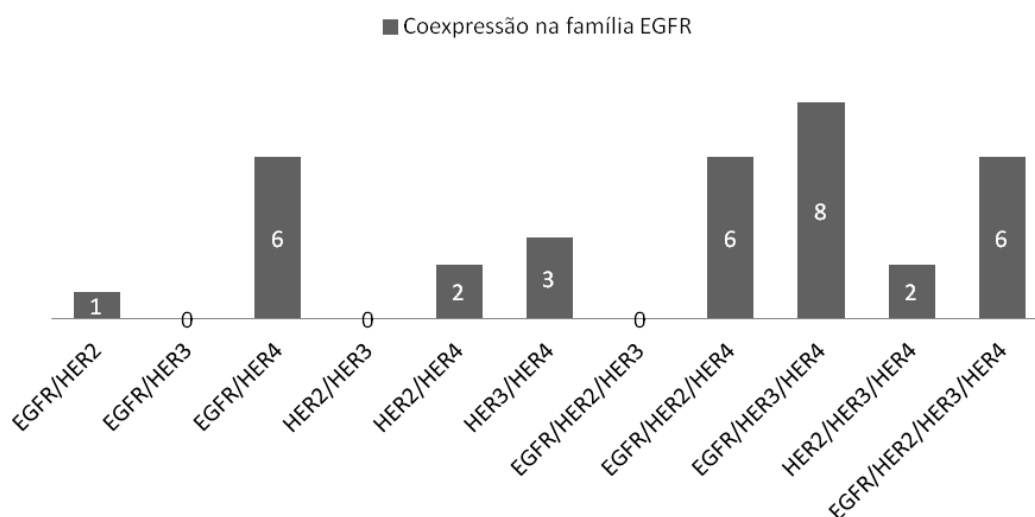


Figura 10. Quantidade de casos com coexpressão de membros da família EGFR dentre as possibilidades de expressão simultânea.

2.1.1 Associação entre membros da família EGFR e características clinicopatológicas

A expressão proteica foi escolhida para a avaliação da relação com os fatores clinicopatológicos devido à influência biológica destes fatores ser refletida na expressão de proteínas. Não foi observada relação entre a família EGFR e o histotipo tumoral. EGFR/HER1 e HER2 demonstram associação com a graduação histológica, ao passo que EGFR/HER1, HER3 e HER4 revelaram estar associados com o comprometimento nodal nos casos avaliados. A tabela 8 demonstra os resultados estatísticos da associação entre os membros da família EGFR e os parâmetros clinicopatológicos avaliados.

Quando se compara a coexpressão dos membros da família EGFR e as variáveis clinicopatológicas, a coexpressão HER3/HER4 demonstrou uma relação com o histotipo tumoral ($P = 0,0208$). Os resultados relacionados ao histotipo, grau histológico e estado nodal em relação à expressão concomitante de dois membros da família EGFR é demonstrada na tabela 9. Quando mais do que dois membros são coexpressos, a expressão simultânea de EGFR/HER1, HER2 e HER4 apresentou uma forte relação com a graduação histológica ($P = 0,0013$) (Tabela 10).

Tabela 8. Expressão de membros da família EGFR em relação às características clinicopatológicas

Parâmetro	EGFR		HER2		HER3		HER4	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Graduação histological								
I	13	14	7	20	12	15	26	1
II	9	2	6	5	7	4	10	1
III	5	0	4	1	1	4	5	0
Valor de P	0,0083*		0,0105*		0,7355		0,9807	
Estado do LN								
Negativo	19	14	12	21	16	17	33	2
Positivo	9	1	5	5	4	6	10	0
P	0,0002*		0,1627		0,0409*		<0,0001*	

* situações com relação estatística significativa;

LN, linfonodo; EGFR, epidermal growth factor receptor

Tabela 9. Características clinicopatológicas dos pacientes de acordo com a coexpressão de membros da família EGFR.

Parâmetros clínicos	EGFR/HER2					EGFR/HER4					HER2/HER4					HER3/HER4				
	Positivo		Negativo		Valor de <i>P</i>	Positivo		Negativo		Valor de <i>P</i>	Positivo		Negativo		Valor de <i>P</i>	Positivo		Negativo		Valor de <i>P</i>
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%		<i>N</i>	%	<i>N</i>	%		<i>N</i>	%	<i>N</i>	%		<i>N</i>	%			
<i>Histotipo</i>																				
Ca. tubulopapilífero	0	-	21	4,8		4	9,3	17	39,5		1	2,3	20	46,5		0	-	21	48,8	
Ca. complexo	0	-	11	25,6	0,1928	2	4,6	9	20,9	0,1684	1	2,3	10	23,2	0,6217	1	2,3	10	23,2	0,0208*
Ca. tumor misto	1	2,3	8	18,6		0	-	9	20,9		0	-	9	20,9		1	2,3	8	18,6	
Outros	0	-	2	4,6		0	-	2	4,6		0	-	2	4,6		1	2,3	1	2,3	
<i>Graduação histological</i>																				
I	0	-	27	62,8		4	9,3	23	53,5		2	4,6	25	58,1		3	7,0	24	55,8	
II	0	-	11	25,6	0,0277*	2	4,6	9	20,9	0,5556	0	-	11	25,6	0,3085	0	-	11	25,6	0,2067
III	1	2,3	4	9,3		0	-	5	11,2		0	-	5	11,2		0	-	5	11,2	
<i>Estado do LN</i>																				
+	0	-	10	23,2	0,0072*	2	4,6	8	18,6	0,4065	0	-	10	23,2	0,0261*	1	2,3	9	20,9	0,0679
-	1	2,3	32	74,4		4	9,3	29	67,4		2	4,6	31	72,1		2	4,6	31	72,1	

* situações com relação estatística significativa;

N, número; *LN*, linfonodo; *EGFR*, epidermal growth factor receptor; *Ca*, Carcinoma.

Tabela 10. Características clinicopatológicas dos pacientes com coexpressão simultânea de mais de dois membros da família EGFR.

Parâmetros clínicos	EGFR/HER2/HER4					EGFR/HER3/HER4					HER2/HER3/HER4					EGFR/HER2/HER3/HER4				
	Positivo		Negativo		Valor de <i>P</i>	Positivo		Negativo		Valor de <i>P</i>	Positivo		Negativo		Valor de <i>P</i>	Positivo		Negativo		Valor de <i>P</i>
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%		<i>N</i>	%	<i>N</i>	%		<i>N</i>	%	<i>N</i>	%		<i>N</i>	%	<i>N</i>	%	
<i>Histotipo</i>																				
Ca. tubulopapilífero	4	9,3	17	39,5		3	7,0	18	41,9		0	-	21	48,8		4	9,3	17	39,5	
Ca. complexo	1	2,3	10	23,2	0,3683	2	4,6	9	20,9	0,5268	1	2,3	10	23,2	0,2809	0	-	11	25,6	0,6730
Ca. tumor misto	1	2,3	8	16,6		3	7,0	6	13,9		1	2,3	8	18,6		2	4,6	7	16,3	
Outros	0	-	2	4,6		0	-	1	2,3		0	-	2	4,6		0	-	2	4,6	
<i>Graduação histological</i>																				
I	1	2,3	26	60,5		5	11,2	22	51,2		1	2,3	26	60,5		3	7,0	24	55,8	
II	2	4,6	9	20,9	0,0013*	2	4,6	9	20,9	0,9581	1	2,3	10	23,2	0,9807	3	7,0	8	18,6	0,9647
III	3	7,0	2	4,6		1	2,3	4	9,3		0	-	5	11,2		0	-	5	11,2	
<i>Estado do LN</i>																				
+	3	7,0	7	16,3	0,4065	1	2,3	9	20,9	0,7916	0	-	10	23,2	0,3085	2	4,6	8	18,6	0,4065
-	3	7,0	30	69,8		7	16,3	26	60,5		2	4,6	31	72,1		4	9,3	29	6,4	

* situações com relação estatística significativa;

N, número; *LN*, linfonodo; *EGFR*, epidermal growth factor receptor; *Ca*, Carcinoma.

2.1.2 Associação entre membros da família EGFR e sobrevida

As taxas de sobrevida global observadas demonstraram uma associação significativa com a expressão de EGFR/HER1 ($P = 0,0002$) e HER2 ($P = 0,0291$) e um desfecho desfavorável (Figura 11). Entretanto, não foram observadas relações significativas quando relacionadas a sobrevida global e a expressão de HER3 ou HER4 nos tumores mamários das cadelas. Quando avaliando a coexpressão dos membros da família EGFR, a expressão simultânea de todos os membros e a expressão simultânea de EGFR/HER1, HER2 e HER4 demonstrou associação com um desfecho desfavorável ($P = 0,0256$ e $P = 0,0415$, repectivamente).

A análise multivariada de regressão Cox não demonstrou interações entre a expressão isolada de membros da família EGFR e a sobrevida global. Entretanto, quando a coexpressão foi considerada, a expressão simultânea de todos os membros da família EGFR revelou ser um indicador prognóstico independente do estado nodal e da graduação histológica ($P = 0,0378$).

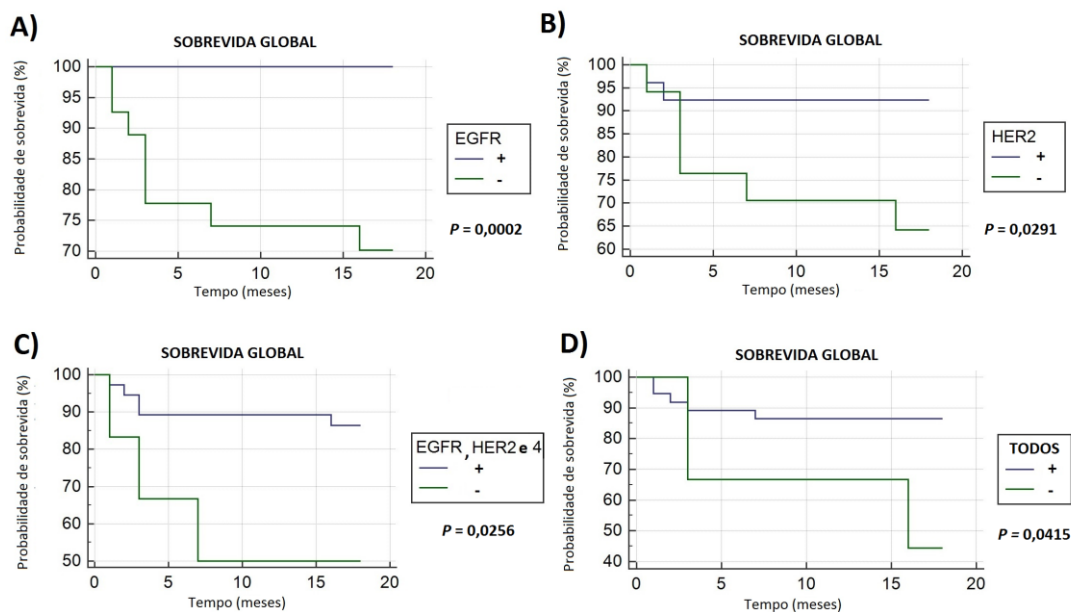


Figura 11. Curvas de sobrevida e expressão de membros da família EGFR. A) EGFR/HER1; B) HER2; C) Coexpressão de EGFR/HER1, HER2 e HER4; D) Coexpressão de EGFR/HER1, HER2, HER3 e HER4.

2.2 SUPERFAMÍLIA ABC

A expressão de glicoproteína-P (Figura 12) e MRP1 se deu principalmente na membrana das células neoplásicas, porém frequentemente estava associada com imunoreação positiva no citoplasma (Figura 13).

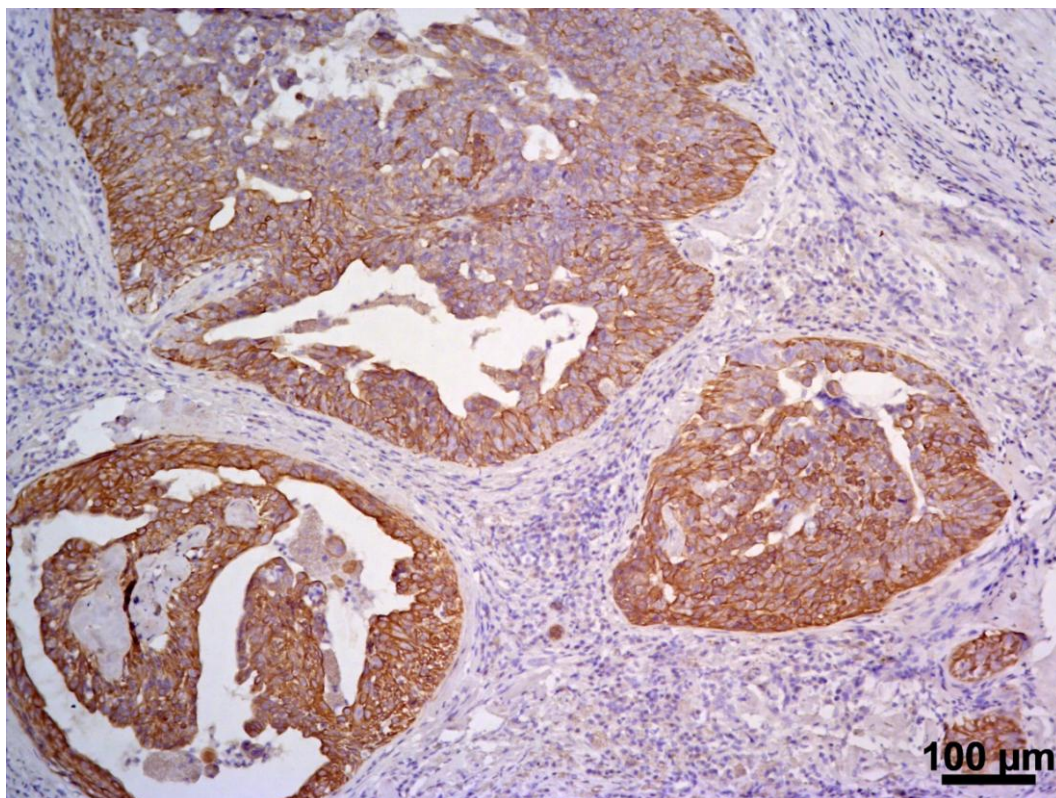


Figura 12. Carcinoma mamário canino com expressão acentuada de glicoproteína-P ao longo da membrana e em menor proporção no citoplasma. Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.

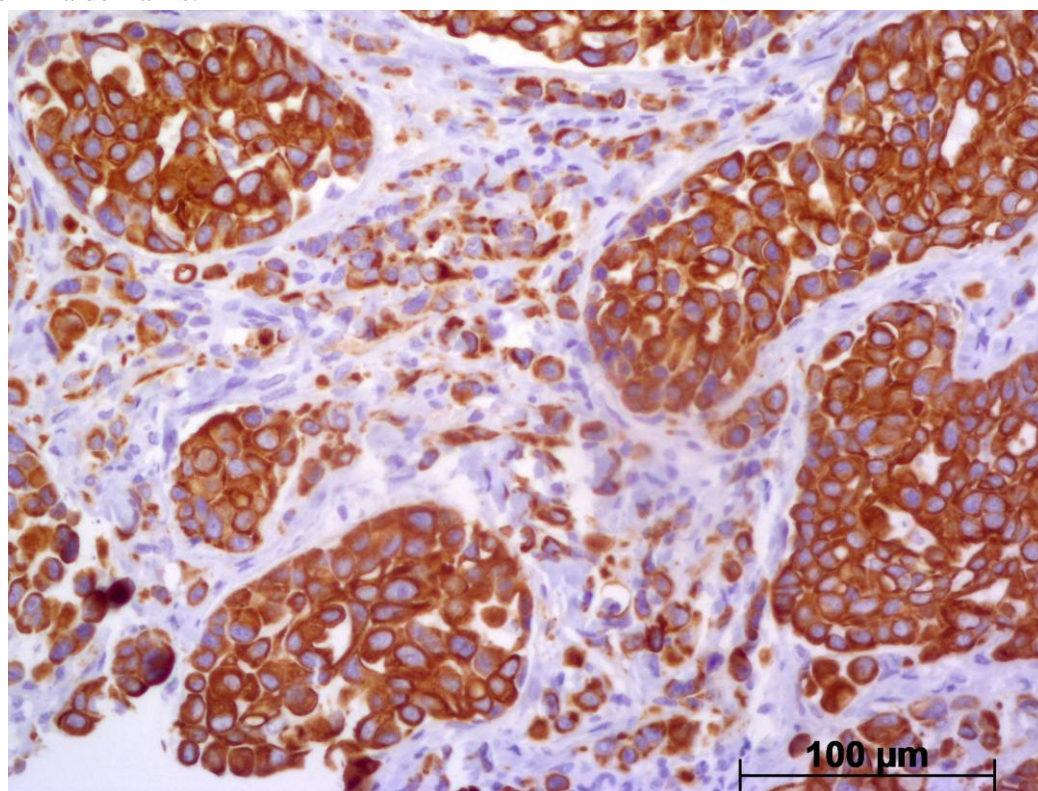


Figura 13. Expressão positiva acentuada de MRP1, com reação intensa na membrana e citoplasma. Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.

A expressão de MRP2 foi fraca e principalmente citoplasmática (Figura 14). No total, 24 casos se mostraram positivos para glicoproteína-P, 16 casos se mostraram positivos para MRP1 e 17 casos apresentaram resultados positivos para MRP2. Em todos os casos positivos eles foram expressos por células luminais mamárias.

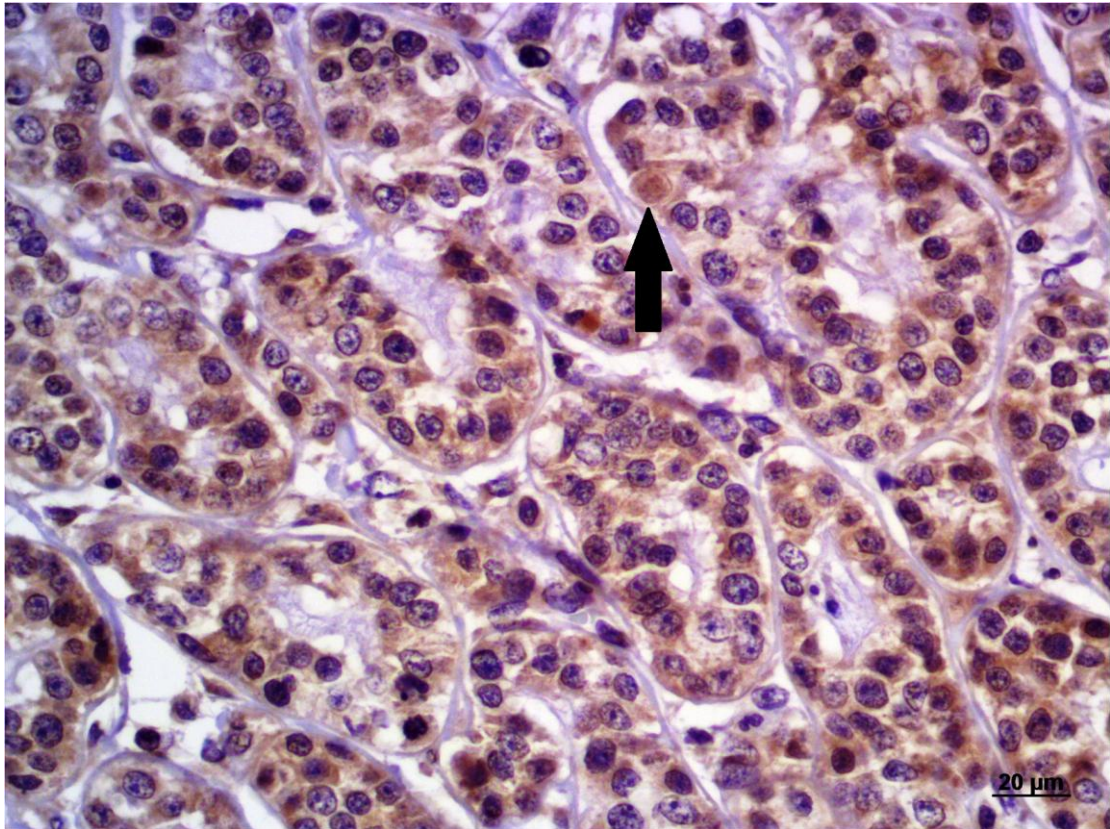


Figura 14. Expressão positiva fraca de MRP2, principalmente no citoplasma e ocasionalmente na membrana (seta). Imunoistoquímica com DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.

2.2.1 Associação entre a expressão da superfamília ABC e parâmetros clinicopatológicos

Não houve associação entre a expressão dos transportadores ABC e o histotipo tumoral. Uma associação positiva entre a expressão de glicoproteína-P e a presença de metástases nodais foi verificada ($P = 0,0038$), assim como uma relação com a graduação histológica ($P = 0,0353$). Por sua vez, MRP1 demonstrou uma forte associação com uma graduação histológica maior ($P < 0,0001$), mas não demonstrou relação com o estado nodal. Não foram observadas relações entre a expressão de MRP2 e as características clinicopatológicas dos pacientes. Os resultados dos histotipos tumorais, graduação histológica e estado nodal de acordo com a expressão de glicoproteína-P, MRP1 e MRP2 estão sumarizadas na tabela 11.

Tabela 11. Características clinicopatológicas de acordo com a expressão de proteínas transportadoras ABC.

Parâmetro clínico	Glicoproteína-P					MRP1					MRP2				
	Positivo		Negativo		Valor de P	Positivo		Negativo		Valor de P	Positivo		Negativo		Valor de P
	N	%	N	%		N	%	N	%		N	%	N	%	
Histotipo															
Ca. tubulopapilífero	11	25,5	10	23,6	0,9044	7	16,3	14	32,5	0,112	9	20,9	12	30,3	0,6727
Ca. complexo	6	13,9	5	11,6		4	9,3	7	16,3		4	9,3	7	16,3	
Ca.tumor misto	6	13,9	3	7,2		5	11,6	4	9,3		4	9,3	5	11,6	
Outros	1	2,3	1	2,3		0	-	2	4,7		0	-	2	4,7	
Graduação histológica															
I	11	25,6	16	37,2	0,0353	0	-	27	62,8	<0,0001	12	27,9	15	34,9	0,5721
II	9	20,9	2	4,7		11	25,6	0	-		4	9,3	7	16,3	
III	4	9,3	1	2,3		5	11,6	0	-		1	2,3	4	9,3	
Estado do LN															
+	10	23,3	0	-	0,0038	6	13,9	4	9,3	0,2402	4	9,3	6	13,9	0,1627
-	14	32,5	19	44,2		10	23,3	23	53,5		13	30,3	20	46,5	

* situações com relação estatística significativa;

N, número; LN, linfonodo; *MRP1*, multidrug resistance-associated protein 1; *MRP2*, multidrug resistance-associated protein 2; Ca, Carcinoma.

2.2.2 Associação entre transportadores ABC e sobrevida

Quando avaliando a relação das proteínas da superfamília ABC com a sobrevida global dos animais neste estudo, observou-se que a expressão de glicoproteína-P nos tumores estava significativamente associada com um desfecho desfavorável para o animal ($P = 0,0245$) (Figura 15A), de maneira semelhante ao que foi observado para a expressão de MRP1 ($P = 0,0002$) (Figura 15B). Ademais, a expressão de MRP1 foi determinada como um indicador prognóstico independente do estado nodal quando utilizando a regressão de Cox para análise multivariada ($P = 0,0216$). A expressão de MRP2, por sua vez, não demonstrou relação com o desfecho clínico dos pacientes.

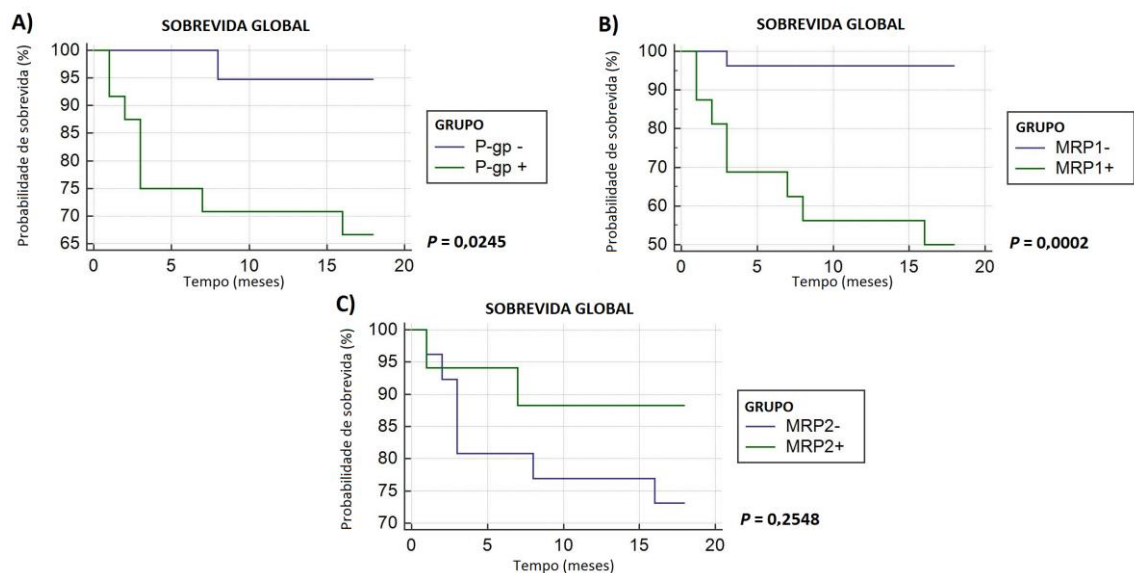


Figura 15. Curvas de sobrevida e expressão de transportadores ABC. Relação da expressão de (A) Glicoproteína-P, (B) MRP1 e (C) MRP2 com a sobrevida global dos pacientes. Adaptado de SALGADO et al., 2015.

CAPÍTULO IV: DISCUSSÃO GERAL

1 FAMÍLIA EGFR

Neste estudo, a expressão de EGFR esteve associada com características que refletem um prognóstico ruim, incluindo a graduação histológica, metástases linfáticas e morte. Estudos prévios notaram a mesma relação com a graduação histológica (GAMA et al., 2009; BERTAGNOLI et al., 2001; CARVALHO et al., 2013). No presente estudo foi observada a mesma correlação entre tumores superexpressos para HER2 com a graduação histológica relatada por outros autores (DUTRA et al., 2004; SHINODA et al., 2014). Para HER3, há somente um estudo recente na literatura veterinária (KIM et al., 2011) que relaciona sua expressão nos tumores mamários das cadelas, revelando resultados semelhantes no que diz respeito à invasão linfovascular. Entretanto, não há estudos prévios que avaliam a expressão de HER4 nos tumores mamários caninos e pouco se sabe acerca de seu significado prognóstico mesmo no câncer da mama da mulher. Alguns estudos ligaram a expressão de HER4 com um fenótipo bem diferenciado (KEW et al., 2000; SUO et al., 2002) e estado de receptores hormonais positivo (KNOWLTON et al., 1998; SUO et al., 2002), com características de expressão proteica e de associação com características clinicopatológicas semelhantes às observadas neste estudo.

Alguns dados sugerem que os membros da família EGFR podem formar homo e heterodímeros com outros membros da família e, conseqüentemente, apresentam um perfil complexo de sinalização intracelular (BRANDT et al., 1999). Tais características podem interferir na resposta ao tratamento, tais como indicado por dados recentes (GREEN et al., 2014; ZHANG et al., 2014). Não estão disponíveis outros estudos na literatura veterinária que avaliam a imunoexpressão dos quatro receptores da família EGFR simultaneamente, com a maioria dos estudos anteriores relatando a expressão de somente um (DUTRA et al., 2004; GAMA et al., 2009; CARVALHO et al., 2013; SHINODA et al., 2014) ou dois receptores (BERTAGNOLI et al., 2011; KIM et al., 2011). Visto que se sabe que os membros da família EGFR agem sinergisticamente com outro receptor por meio da formação de dímeros nos seres humanos (BRANDT et al., 1999; YARDEN & SLIWKOWSKI., 2001; ZHANG et al., 2014), a detecção da coexpressão nesta família se vê como uma característica particularmente importante de ser avaliada.

Neste estudo foi observado que 17,6% dos tumores expressaram todos os membros da família EGFR simultaneamente. Para quando HER3 e HER2 são avaliados de forma isolada e para quando HER3 e EGFR/HER1 são coexpressos, não foram observados casos com este perfil de expressão. Apesar disso, quando avaliando HER2 e HER4 em coexpressão, um desfecho melhor foi observado, em linha com os resultados observados em Breno Souza Salgado

mulheres (SUO et al., 2002) nas quais HER4 antagoniza o efeito clínico ruim de HER2 no câncer de mama. Casos que coexpressaram mais de dois membros da família EGFR demonstraram apresentar uma sobrevida global pior, sugerindo que uma possível superativação da família EGFR está relacionada com maior agressividade dos tumores mamários nas cadelas.

Dado que a oncologia veterinária e humana enfrentam desafios semelhantes tais como taxas comparáveis de certos tipos tumorais (KHANNA et al., 2006; PINHO et al., 2012; MARCONATO et al., 2013; TERRAGNI et al., 2014) – com estudos inclusive que relatam taxas maiores de câncer de mama nos cães do que nos seres humanos (OWEN, 1979; QUEIROGA et al., 2011) – os dados aqui apresentados indicam que a coexpressão de membros da família EGFR pode representar uma base útil para o tratamento utilizando múltiplos ou diferentes alvos desta família, especialmente porque dados recentes acerca da utilização de imunoterapia para membros da família EGFR (SINGER et al., 2014) e outras proteínas demonstram que eles também são promissores nos cães (KILLICK et al., 2015).

A complexidade nos padrões de expressão observados neste estudo, inclusive com diferenças nas curvas de sobrevida, indica que uma classificação dos tumores mamários em subgrupos pode ser útil na diferenciação dos pacientes no que diz respeito ao seu desfecho. Esta característica leva à sugestão de que o valor preditivo da família EGFR é otimizado pela combinação dos resultados de expressão de todos os membros da família ao invés de somente avaliar um receptor isolado. Verificou-se, ainda, que HER4 possui uma relação diferente com as características clinicopatológicas dos carcinomas mamários caninos, o que implica no fato de que é melhor aplicar o conhecimento disponível em outros membros da família EGFR no que diz respeito à avaliação e tratamento dos cães com câncer de mama.

2 SUPERFAMÍLIA ABC

Diversos transportadores estão implicados na resistência multidrogas e constituem causas reconhecidas de falha na quimioterapia antineoplásica (TROCK et al., 1997; ABOLHODA et al., 1999; WENZELL et al., 2007; AMIRI-KORDESTANI et al., 2012; HEDDITCH et al., 2014). Este é o caso do transportador de efluxo de moléculas dependente de ATP glicoproteína-P (também denominada ABCB1 ou MDR1), para a qual a expressão nas células neoplásicas foi relacionada com um mecanismo bem determinado de resistência à múltiplas drogas por meio da diminuição do acúmulo intracelular das moléculas (WENZELL et al., 2007).

Nos casos aqui avaliados, a expressão de transportadores ABC foi confinada às células luminais mamárias. Outros autores (KIM et al., 2012) revelaram uma expressão de glicoproteína-P nas células mioepiteliais de neoplasias mamárias, diferente do que foi observado nos tumores avaliados neste estudo. Esta característica se deu provavelmente devido à utilização do clone C219 por tais autores – anticorpos estes os quais apresentam comprovada reatividade cruzada com diversas outras proteínas (VAN DEN ELSEN et al., 1999). De maneira a evitar tais reações cruzadas, nós utilizamos um clone mais específico de modo a produzir resultados mais fiéis.

Este estudo avaliou o possível papel prognóstico dos transportadores ABC glicoproteína-P, MRP1 e MRP2 em uma série de 43 tumores mamários caninos. Dada a função de transporte de moléculas e a capacidade de realizar extrusão de substâncias inerente à tais componentes (FLETCHER et al., 2010), é importante promover um esclarecimento de seu papel na patobiologia das neoplasias mamárias da cadela. Uma possível influência da expressão de proteínas transportadores ABC nos tumores de mama caninos foi previamente e recentemente documentada (PETTERINO et al., 2006; KIM et al., 2012; KOLTAI & VALJDOVICH, 2014), porém os resultados não são conclusivos. Nos seres humanos, alguns autores relataram perda da expressão de MRP1 em casos histologicamente pouco diferenciados, sugerindo que a diminuição nos níveis de MRP1 está associada com perda de diferenciação (BECK et al., 1998; FERRERO et al., 2000). Uma associação entre MRP1 e MDR1/glicoproteína-P e estadios tumorais mais avançados também foi sugerida (FILIPITS et al., 1996; NOOTER et al., 1997a; SUN et al., 2000), de maneira similar ao que foi observado no presente estudo, sugerindo que MRP1 e a glicoproteína-P possuem importância para o desfecho da doença.

MRP1 e MDR1 demonstraram conferir resistência a múltiplas drogas *in vitro* em linhagens de células cancerosas humanas (GOTO et al., 2000; FERREIRA et al., 2005; NAKAI et al., 2009) e também em linhagens de células mamárias de cães (PAWLOWSKI et al., 2013). Adicionalmente, também demonstraram estar associadas com um desfecho desfavorável para o paciente e/ou quimiorresistência em diferentes tipos de neoplasias caninas (GASPAR et al., 2010; TENG et al., 2012), incluindo tumores mamários (KOLTAI & VALJDOVICH, 2014). No presente estudo foi avaliada a expressão proteica de glicoproteína-P, MRP1 e MRP2, observando que a expressão de glicoproteína-P e MRP1 é mais consistente nos tumores com maior grau histológico e com metástases nodais, apresentando também uma relação com uma diminuição na sobrevida, em linha com resultados que caracterizaram a

glicoproteína-P como um indicador prognóstico nos tumores mamários caninos (KOLTAI & VALJDOVICH, 2014).

Diferentes estudos foram realizados para avaliar a expressão de MRP2 em cânceres nos seres humanos, incluindo o carcinoma colorretal (HINOSHITA et al., 2000), o câncer de pulmão (YOUNG et al., 1999) e de mama (CHOI et al., 2000), de modo a caracterizar sua relação com a resistência contra agentes terapêuticos. Uma vez que MRP2 está envolvida no efluxo de diversos agentes antineoplásicos, estes achados podem indicar que as células neoplásicas podem adquirir uma resistência à quimioterápicos por meio da atividade aumentada de MRP2. Visto que não existem dados relacionando a expressão de MRP2 e os tumores mamários caninos, não é possível relacionar diretamente este transportador ABC com a resistência a fármacos na espécie. Em relação ao prognóstico, não foi observada relação entre MRP2 e as características clinicopatológicas dos pacientes, de acordo com estudos os quais avaliaram a expressão de MRP2 em cânceres nos seres humanos (OTA et al., 2009; TIAN et al., 2012).

De modo geral, os resultados aqui apresentados sugerem que a glicoproteína-P e MRP1 não somente são candidatos promissores para estudos de validação sobre tratamentos no câncer de mama canino, como também possuem um papel importante no curso da progressão neoplásica nestes tumores.

CAPÍTULO V: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados observados neste estudo, é possível concluir que membros da família de transportadores ABC, a dizer a glicoproteína-P e MRP1, funcionam como marcadores prognósticos nos carcinomas mamários das cadelas, não sendo importante somente como proteínas de resistência à múltiplas drogas para essas neoplasias. Além disso, MRP1 é um indicador prognóstico independente nestes tumores, ao passo que MRP2 não possui relação direta com o desfecho da doença.

É possível concluir, também, que a expressão de EGFR/HER1 e HER2 nos carcinomas mamários de cadelas está associada com um curso clínico desfavorável, levando à sugestão de que EGFR/HER1 e HER2 podem constituir alvos terapêuticos promissores no câncer de mama canino. Adicionalmente, conclui-se que a expressão de HER4 é um fenômeno constante nas neoplasias mamárias de cadelas, enquanto a coexpressão de membros da família EGFR é um importante indicador prognóstico a ser avaliado nas neoplasias mamárias das cadelas, e não somente a expressão isolada de membros desta família.

2. PERSPECTIVAS

2.1 Superfamília ABC como biomarcador do câncer e na resposta ao tratamento

Em vista dos resultados terem identificado uma relação entre a glicoproteína-P e MRP1 com o desfecho dos animais, é importante realizar a validação dos resultados de expressão proteica com a verificação dos níveis de expressão de RNAm nos tumores dos animais. Com isso, espera-se determinar se os níveis de transcrito variam de acordo com a imunoexpressão nos tumores dos animais. Além disso, é importante caracterizar o perfil de expressão em animais pré- e pós-tratamento, de modo a verificar possíveis variações no funcionamento destas proteínas nos tumores mamários caninos.

2.2 Membros da família EGFR como biomarcadores do câncer

Os resultados identificaram uma relação entre EGFR e HER2 nos pacientes com câncer de mama e a sobrevida global. Em vista disso, trabalhos futuros devem focar na validação dos resultados por meio da verificação do estado de amplificação ou não destas moléculas, com a realização do pareamento dos resultados com os níveis de expressão de RNAm nas amostras. Além disso, é importante focar no desenvolvimento da tecnologia para ter como alvo terapêutico estas moléculas nos pacientes caninos com tumores mamários. Visto que a expressão destas proteínas já foi caracterizada como restrita em tecidos normais e de alta expressão em pacientes com doença metastática, esta abordagem pode apresentar benefícios. Ademais, trabalhos futuros devem envolver a análise de um amplo grupo de tumores de maneira a verificar ainda o potencial prognóstico e preditivo destas moléculas.

REFERÊNCIAS

- Abbott BL, Colapietro AM, Barnes Y, et al. 2002. Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples. **Blood**. 100:4595-4601.
- Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, et al. 2004. Expression and co-expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast cancer. **Br. J. Cancer**. 91:1532-1542.
- Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, et al. 1963. Production of a embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. **Transplantation**. 1:174-180.
- Abolhoda A, Wilson AE, Ross H, et al. 1999. Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. **Clin. Cancer. Res.** 5:3352-3356.
- Agarwal P, Sandy M, Delnnocentes P, et al. 2013. Tumor suppressor gene p16/INK4A/CDKN2A-dependente regulation in and out of the cell cycle in a spontaneous canine model of breast cancer. **J. Cell Biochem**. 114:1355-1363.
- Ahern TE, Bird RC, Bird AEC, et al. 1996. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. **Am. J. Vet. Res.** 57:693-696.
- Alimandi M, Romano A, Curia MC, et al. 1995. Cooperative signaling of erbb3 and erbb2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. **Oncogene**. 10:1813-1821.
- Allen JD, Schinkel AH. 2002. Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). **Mol. Cancer Ther.** 1:427-434.
- Alroy I, Yarden Y. 1997. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. **FEBS. Lett.** 410:83-86.
- Amiri-Kordestani L, Basserville A, Kurdziel K, et al. 2012. Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. **Drug Resist. Updat.** 15:50-61.
- Aquino U, Pinheiro LGP, Vasques PHD, et al., 2012. Experimental canine model for sentinel lymph node biopsy in the vulva using technetium and patent blue dye. **Acta Cir. Bras.** 27:102-108.

Balakrishnan L, Venter H, Shilling RA, et al. 2004. Reversible transport by the ATP-binding cassette multidrug export pump LmrA: ATP synthesis at the expense of downhill ethidium uptake. **J. Biol. Chem.** 279:11273-11280.

Baselga J, Albanell J, Molina MA, et al. 2001. Mechanisms of action of trastuzumab and scientific update. **Semin. Oncol.** 28:4-11.

Baselga J, Arteaga CL. 2005. Critical update and emerging trend in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. **J. Clin. Oncol.** 23:2445-2459.

Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, et al. 1981. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. **J. Clin. Invest.** 68:1331-1337.

Bates SE. 2003. Solving the problem of multidrug resistance: ABC transporters in clinical oncology. In: Holland IB, Cole SP, Kuchler K, Higgins CF (Eds.). **ABC Proteins from Bacteria to Man**. Londres: Academic Press. p. 359-392.

Baum M, Buzdar A, Cuzick J, et al. 2003. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. **Cancer.** 98:1802-1810.

Beauvais W, Cardwell JM, Brodbelt DC. 2012. The effect of neutering on the risk of mammary tumors in dogs – a systematic review. **Small Anim. Pract.** 53:314-322.

Beck WT, Grogan TM, Willman CL, et al. 1996. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patient's tumors: consensus recommendations. **Cancer Res.** 56:3010-3020.

Beck J, Bohnet B, Brugger D, et al. 1998. Multiple gene expression analysis reveals distinct differences between G2 and G3 stage breast cancers and correlations of PCKeta with MDR1, MRP and LRP gene expression. **Br. J. Cancer.** 77:87-91.

Bender LM, Nahta R. 2008. Her2 crosstalk and therapeutic resistance in breast cancer. **Front. Biosci.** 13:3906-3912.

Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ. 1999. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Vet. Pathol.** 36:423–36.

- Bernhard H, Salazar L, Schiffman K, et al. 2002. Vaccination against HER-2;neu oncogenic protein. **Endocr. Relat. Cancer.** 9:33-44.
- Bertagnolli A, Ferreira E, Dias EJ, et al. 2011. Canine mammary mixed tumors: immunohistochemical expressions of EGFR and HER2. **Aust. Vet. J.** 89:312-317.
- Brandt BH, Roetger A, Dittmar T, et al. 1999. C-erbB-2/EGFR as dominant heterodimerization partners determine a motogenic phenotype in human breast cancer cells. **FASEB. J.** 13:1939-1949.
- Brangi M, Litman T, Ciotti M, et al. 1999. Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC) mitoxantraone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. **Cancer Res.** 59:5938-5946.
- Brevig T, Kruhne U, Kahn RA, et al. 2003. Hydrodynamic guiding for addressing subsets of immobilized cells and molecules in microfluidic systems. **BMC Biotechnol.** 3:10.
- Bristow RG, Hill RP. 2008. Hypoxia and metabolism: hypoxia, DNA repair and genetic instability. **Nat. Rev. Cancer.** 8:180-192.
- Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR. 1983. Canine mammary gland neoplasias. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** 19:61-90.
- Bruning PF, Bonfrer JM, van Noord PA, et al. 1992. Insulin resistance and breast cancer risk. **Int. J. Cancer.** 52:511-516.
- Buchler M, Konig J, Brom M, et al. 1996. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. **J. Biol. Chem.** 271:15091-15098.
- Burger H, Foekens JA, Look MP, et al. 2003. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2 and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. **Clin. Cancer Res.** 9:827-836.
- Burris H 3rd, Yard D, Jones S, et al. 2004. Phase II trial of trastuzumab followed by weekly paclitaxel/carboplatin as first-line treatment for patients with metastatic breast cancer. **J. Clin. Oncol.** 22:1621-1629.

Buzdar AU, Hortobagyi G. 1998. Update on endocrine therapy for breast cancer. **Clin. Cancer Res.** 4:527-534.

Candeil L, Gourdier I, Peyron D, et al. 2004. ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. **Int. J. Cancer.** 109:848-854.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. 2006. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA.** 295:2492-2502.

Carpenter G, Cohen S. 1979. Epidermal growth factor. **Ann. Rev. Biochem.** 48:193-216.

Carvalho MI, Guimarães MJ, Pires I, et al. 2013. EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumors. **Res. Vet. Sci.** 95:1094-1099.

Cassali GD, Gobbi H, Gartner F, *et al.* 1999. Secretory carcinoma of the canine mammary gland. **Vet. Pathol.** 36:601-603.

Cassali GD, Serakides R, Gartner F, *et al.* 2002. Invasive micropapillary carcinoma of the dog mammary gland. A case report. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 24:366–369.

Cassali GD, Gärtner F, Schmitt FC. 2002. Pleomorphic lobular carcinoma of the canine mammary gland: histopathologic and immunohistochemical features. **Arq Bras Med Vet Zootec.** 54:592–594.

Chang S-C, Liao J-W, Wong M-L, et al. 2007. Mammary carcinoma with sebaceous differentiation in a dog. **Vet. Pathol.** 44:525-527.

Chang C-C, Tsai M-H, Liao J-W, et al. 2009. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 235:391-396.

Choi H-K, Yang J-W, Roh S-H, et al. 2007. Induction of multidrug resistance associated protein 2 tamoxifen-resistant breast cancer cells. **Endocr. Relat. Cancer.** 2007. 14:293-303.

Christensen GC. The mammae. In: Evans HE, Christensen GC (eds.). 1979. **Miller's anatomy of the dog**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1979. p. 101–106.

Citri A, Skaria KB, Yarden Y. 2003. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. **Exp. Cell. Res.** 284:54-65.

Clynes RA, Towers TL, Presta LG, et al. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. **Nature Med.** 6:443-446.

Cohen BM, Green JM, Foy L, et al. HER4-mediated biological and biochemical properties in NIH3T3 cells – evidence of HER1-HER4 heterodimers. **J. Biol. Chem.** 271:4813-4818.

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science.** 258:1650-1654.

Colleoni M, Rotmensz N, Maisonneuve P, et al. 2007. Prognostic role of the extent of peritumoral vascular invasion in operable breast cancer. **Ann. Oncol.** 18:1632-1640.

Cooray HC, Blackmore CG, Maskell L, et al. 2002. Localization of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. **Neuroreport.** 13:2059-2063.

Cui Y, König J, Buchholz JK, Spring H, et al. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. **Mol. Pharmacol.** 55:929-937.

Cullen JM, Page R, Misdorp W. 2002. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. In: Meuten DJ (Ed.). **Tumors in Domestic Animals**. Ames: Wiley-Blackwell Publishing, 4th ed. p. 1-44.

Culmsee K, Gruber AD, von Samson-Himmelstjerna G, et al. 2004. Quantification of MDR-1 gene expression in canine tissues by real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. **Res. Vet. Sci.** 77:223-229.

Curigliano G, Viale G, Bagnardi V, et al. 2009. Clinical relevance of HER2 overexpression/amplification in patients with small tumor size and node-negative breast cancer. **J. Clin. Oncol.** 27:5693-5699.

Dawson JP, Berger MB, Lin CC, et al. 2005. Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. **Mol. Cell. Biol.** 25:7734-7742.

De Freitas R Jr., Costa MV, Schneider SV, et al. 1991. Accuracy of ultrasound and clinical examination in the diagnosis of axillary lymph node metastases in breast cancer. **Eur. J. Surg. Oncol.** 17:240.

De las Mulas JM, Millan Y, Dios R. 2005. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Vet. Pathol.** 42:200-212.

Deeley RG, Cole SP. 2003. Multidrug resistance protein 1 (ABCC1). In: Holland IB, Cole SP, Kuchler K, Higgins CF (Eds.). **ABC Proteins from Bacteria to Man**. Londres: Academic Press. p. 393-422.

Dexter DW, Reddy RK, Geles KG, et al. Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction measured expression of MDR1 and MRP in primary breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.** 4:1553-1542.

Di Palma S, Colins N, Bilous M, et al. 2008. A quality assurance exercise to evaluate the accuracy and reproductibility of chromogenic in situ hybridisation for HER2 analysis in breast cancer. **J. Clin. Pathol.** 61:757-760.

Dittmar T, Husemann A, Schewe Y, et al. 2002. Induction of cancer cell migration by epidermal growth factor is initiated by specific phosphorylation of tyrosine 1248 of c-erbB-2 receptor via epidermal growth factor receptor. **FASEB J.** 16:1823-1825.

Donnay I, Rauis J, Wouters-Ballman P, et al. 1993. Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal and tumorous canine mammary tissues. **J. Reprod. Fert.** 47:501-512.

Donnay I, Devleeschouwe N, Wouters-Ballman P, et al. 1996. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. **Res. Vet. Sci.** 60:251-254.

Downward J, Parker P, Waterfield MD. 1984a. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. **Nature.** 311:483-485.

Downward J, Yarden Y, Mayes E, et al. 1984b. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. **Nature.** 307:521-527.

Dowsett M. 2003. Analysis of time to recurrence in the ATAC (arimidex tamoxifen, alone or in combination) trial according to estrogen receptor and progesterone receptor status. **Breast Cancer Res. Treat.** 82:S7-S7

Doyle LA, Ross DD. 2003. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). **Oncogene.** 22:7340-7358.

Dutra AP, Granja NVM, Schmitt FC, et al. 2004. C-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 1673-1681.

Elston CW, Ellis IO. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology.** 19:403-410.

Evers R, Kool M, van Deemter L, et al. 1998. Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. **J. Clin. Invest.** 101:1310-1319.

Ferreira MJU, Gyemant N, Madureira AM, et al. 2005. The effects of jatrophone derivatives on the reversion of MDR1- and MRP-mediated multidrug resistance in the MDA-MB-231 (HTB-26) cell line. **Anticancer Res.** 25:4173-4178.

Ferrero JM, Etienne MC, Formento JL, et al. 2000. Application of an original RT PCR-ELISA multiplex assay for MDR1 and MRP, along with p53 determination in node-positive breast cancer patients. **Br. J. Cancer.** 82:171-177.

Filipits M, Suchomel RW, Dekan G, et al. 1996. MRP and MDR1 gene expression in primary breast carcinomas. **Clin. Cancer Res.** 1231-1237.

Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, et al. 2010. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **Nat. Rev. Cancer.** 10:147-156.

Friedrich RE, Punke C, Reymann A, 2004. Expression of multi-drug resistance genes (MDR1, MRP1, BCRP) in primary oral squamous cell carcinoma. **In Vivo.** 18:133-147.

Gama A, Alves A, Schmitt F. 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archiv.** 453:123-132.

Gama A, Gartner F, Alves A, et al. 2009. Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. **Res. Vet. Sci.** 87:432-437.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, et al. 2002. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. **Cell Press.** 110:763-773.

Garnock-Jones KP, Keating GM, Scott LJ. 2010. Trastuzumab: a review of its use as adjuvant treatment in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive early breast cancer. **Drugs.** 70:215-239.

Gaspar LFJ, Ferreira I, Colodel M, et al. 2010. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: cell morphology and influence on P-glycoprotein expression. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 34:447-454.

Gennari R, Fagnoni F, Scelsi M, et al. 2004. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. **Clin. Cancer Res.** 10:5650-5655.

Giancotti V. 2006. Breast cancer markers. **Cancer Lett.** 243:145-159.

Ginn PE. 1996. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. **Vet. Pathol.** 33:533-541.

Glasspool RM, Evans TRJ. 2000. Clinical imaging of cancer metastasis. **Eur. J. Cancer.** 36:1661-1670.

Gold P, Freedman SO. 1965. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. **J. Exp. Med.** 122:467-481.

Goldhirsch A, Gelber JHG, Coates AS, et al. 2005. Senn & Panel Members Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast cancer. **Ann. Oncol.** 16:1569-1583.

Goldschmidt MH, Shofer FS, Smelstoy JA. 2001. Neoplastic lesions of the mammary gland. In: Mohr U (ed.). **Pathobiology of the aging dog.** Ames, IA: Iowa State University Press. p. 168-78.

Goto H, Keshelava N, Matthay KK, et al. 2000. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) expression in neuroblastoma cell lines and primary tumors. **Med. Pediatr. Oncol.** 35:619-622.

Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar SV. 1996. P-glycoprotein and multidrug resistance. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 6:610-617.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat. Rev. Cancer.** 2:48-58.

Graham JC, Myers RK. 1999. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. **J. Vet. Intern. Med.** 13:416-418.

Grandi F, Colodel MM, Monteiro LN, et al. 2010. Extramedullary hematopoiesis in a case of benign mixed mammary tumor in a female dog: cytological and histopathological assessment. **BMC Vet. Res.** 6:45.

Grauss-Porta D, Beerli RR, Daly JM, et al. 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. **Embo. J.** 16:1647-1655.

Green AR, Barros FFT, Abdel-Fatah TMA, et al. 2014. HER2/HER3 heterodimers and p21 expression are capable of predicting adjuvant trastuzumab response in HER2+ breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.** 145:33-44.

Haga S, Nakayama M, Tatsumi K, et al. 2001. Overexpression of the p53 gene product in canine mammary tumors. **Oncol. Rep.** 8:1215-1219.

Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. 2008. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. **Science.** 319:1352-1355.

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. **Cell.** 100:57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. 2011. The hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.** 144:646-674.

Hanf V, Gonder U. 2005. Nutrition and primary preventions of breast cancer: foods, nutrients and breast cancer risk. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.** 123:139-149.

Hayes DF, Bast RC, Desch CE. 1996. Tumor marker utility grading system: a frame work to evaluate clinical utility of tumors markers. **J. Natl. Cancer Inst.** 88:1456-1466.

Hedditch EL, Gao B, Russel AJ, et al. 2014. *ABCA* transporter gene expression and poor outcome in epithelial ovarian cancer. **J. Natl. Cancer Inst.** 7:1-11.

Hellmén E, Svensson S. 1995. Progression of canine mammary tumours as reflected by DNA ploidy in primary tumours and their metastases. **J. Comp. Pathol.** 113:327-342.

Hellmén E. 2005. Complex mammary tumours in the female dog: a review. **J. Dairy Res.** 72:90-97.

Henderson BE, Ross R, Bernstein L. 1988. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award lecture. **Cancer Res.** 48:246–53.

Herbst RS. 2004. Review of epidermal growth factor receptor biology. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** 59:21-26.

Hicks DG, Tubbs RR. 2005. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. **Hum. Pathol.** 36:250-261.

Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, et al. 1999. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. **Cancer Res.** 59:2531-2535.

Hinoshita E, Uchiumi T, Taguchi K, et al. 2000. Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. **Clin. Cancer Res.** 6:2401-2407.

Higgins CF. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annu. Rev. Cell Biol.** 8:67-113.

Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al. 2004. A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 101:14228-14233.

Hoeijmakers JH. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature.** 411:366-374.

Holland IB, Blight MA. 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. **J. Mol. Biol.** 293:381-399.

Holbro T, Beerli R, Maurer F, et al. 2003. The ErbB2 ErbB3 heterodimer functions as a oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. **Med. Sci.** 100:8933-8938.

Hong SH, Privasly ML. 2000. The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: Inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export. **Mol. Cell. Biol.** 20:6612-6625.

Howell A, Osborne CK, Morris C, et al. 2000. ICI182,780 (Festodex): development of a novel “pure” antiestrogen. **Cancer.** 89:817-825.

Hsu W-L, Huang Y-H, Chang T-J, et al. 2010. Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. **Vet. J.** 184:351-356.

Hudis CA. 2007. Drug therapy: Trastuzumab – Mechanism of action and use in clinical practice. **N. Eng. J. Med.** 357:39-51.

Hung LW, Wang IX, Nikaido K, et al. 1998. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. **Nature.** 396:703-707.

Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MU, et al. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. **Nature.** 346:346-362.

Im K-S, Kim I-H, Kim N-H, et al. 2013. Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. **Vet. J.** 195:366-372.

Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, et al. 2003. Herceptin act as an anti-angiogenic cocktail. **Nature.** 416:279-280.

Jackson SP, Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature.** 46:1071-1078.

Jevtic M, Velicki R, Popovic M, et al. 2010. Dietary influence on breast cancer. **J. BUON.** 15:455-461.

Johnston SR, Lu B, Dowsett M, et al. 1997. Comparison of estrogen receptor DNA binding in untreated and acquired antiestrogen-resistant human breast tumors. **Cancer Res.** 57:3723-3727.

Johnston SR, Head J, Pancholi S, et al. 2003. Integration of signal transduction inhibitors with endocrine therapy: an approach to overcoming hormone resistance in breast cancer. **Clin. Cancer Res.** 9:524S-532S.

Jones HB. 1848. On a new substance occurring in the urine with mollities ossium. **Phil. Trnas. R. Soc. Lond.** 138:55-62.

Jones FE, Welte T, Fu XY, et al. 1999. ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation. **J. Cell. Biol.** 147:77-87.

Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, et al. 2000. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. **J. Natl. Cancer Inst.** 92:1651-1656.

Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, et al. 2002. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and photoporphyrin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 99:15649-15654.

Juliano RL, Ling VA. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochim Biophys Acta.** 455:152-162.

Juntilla TT, Sundvall M, Maata JA, et al. 2000. ErbB4 and its isoforms: selective regulation of growth factor responses by naturally occurring receptor variants. **Trends. Cardiovasc. Med.** 10:304-310.

Juntilla TT, Parsons K, Olsson C, et al. 2010. In vivo efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. **Cancer Res.** 70:4481-4489.

Kao CH, Tsai SC, Liu TJ, et al. 2001. P-glycoprotein and multidrug resistance-related protein expressions in relation to technetium-99m methoxyisobutylisonitrile scintimammography findings. **Cancer Res.** 61:1412-1414.

Karayannopoulou M, Fytianou A, Assaloumidis N, et al. 2013. Markers of lipid peroxidation and α -tocopherol levels in the blood and neoplastic tissue of dogs with malignant mammary gland tumors. **Vet. Clin. Pathol.** 42:323-328.

Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, et al. 1995. Activation of the estrogen-receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein-kinase. **Science.** 270:1491-1494.

Kato Y, Asano K, Mizutani I, et al. 2006. Gene expressions of canine angiopoietin-1 and -2 in normal tissues and spontaneous tumours. **Res. Vet. Sci.** 81:280-286.

Kawabata S, Oka M, Soda H, et al. 2003. Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer. **Clin. Cancer Res.** 9:3052-3057.

Keoppler D, Leier R, Jedlitschky G, et al. 1996. The function of the multidrug resistance proteins (MRP and cMRP) in drug conjugate transport and hepatobiliary excretion. **Adv. Enzyme Regul.** 36:17-29.

Kelley MC, Hansen N, McMasters KM. 2004. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. **Am. J. Surg.** 188:49-61.

Kew TY, Bell JA, Pinder SE, et al. 2000. C-erbB-4 protein expression in human breast cancer. **Br. J. Cancer.** 82:1163-1170.

Khanna C, Lindblad-Toh, Vail D, et al. 2006. The dog as a cancer model. **Nat. Biotechnol.** 24:1065-1066.

Khanna C, Lindblad-Toh K, Vail D, et al. 2006. The dog as cancer model. **Nat. Biotechnol.** 24:1065-1066.

Kim JH, Im KS, Kim NH, et al. 2011. Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors. Histopathological and immunohistochemical study. **Vet. J.** 189:318-322.

Kim N-H, Hwang Y-H, Im K-S, et al. 2012. P-glycoprotein in canine mammary gland tumours related with myoepithelial cells. **Res. Vet. Sci.** 93:1346-1352.

Klos KS, Zhou X, Lee S, et al. 2002. Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-2 mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of Akt than either treatment alone. **Cancer Cell**. 98:1377-1385.

Knowlden JM, Gee JM, Seery LT, et al. 1998. C-erbB-3 and c-erbB-4 expression is a feature of endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer. **Oncogene**. 17:1949-1957.

Koike K, Kawabe T, Tanaka T, et al. 1997. A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. **Cancer Res**. 57:5475-5479.

Koltai Z, Valjdovich P. 2014. Expression of multidrug resistance membrane transporter (Pgp) and p53 protein in canine mammary tumours. **Acta. Vet. Hung**. 2:194-204.

Krag DN, Weaver DL, Alex JC, et al. 1993. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel node in breast cancer using a gamma probe. **Surg. Oncol**. 2:335-339.

Krauss MH, Issing W, Miki T, et al. 1989. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 86:9193-9197.

Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, et al. 2004. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. **J. Biol. Chem**. 279:24218-24225.

Kurzman ID, Gilbertson SR. 1986. Prognostic factors in canine mammary tumors. **Semin. Vet. Med. Surg**. 1:25-32.

Lana SE, Rutteman GR, Withrow SI. 2013. Tumors of the mammary gland. In: **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 5th ed. Saunders Elsevier, St. Louis, p. 538-556.

Lane HA, Beuvink I, Motoyama AB, et al. 2000. ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27 (Kip1)-Cdk2 complex formation: Receptor overexpression does not determine growth dependency. **Mol. Cell. Biol**. 20:3210-3223.

Lane HA, Montoyama AB, Beuvink I, et al. 2001. Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling. **Ann. Oncol**. 12:S21-S22.

Le XF, Pruefer F, Bast RC. 2005. HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (Kip1) via multiple signaling pathways. **Cell Cycle**. 4:87-95.

Lee JJ, Hughes CS, Fine RL, et al. 1996. P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. **Cancer**. 77:1892-1898.

Lenferink AE, Simpson JF, Shawver LK, et al. 2000. Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase suppresses tumorigenesis in MMTV/Neu + MMTV/TGF- α bigenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 97:9609-9614.

Leonard GD, Fojo T, Bates SE. 2003. The role of ABC transporters in clinical practice. **Oncologist**. 8:411-424.

Langenbach A, Anderson M, Dambach DM. 1998. Extraskelatal osteosarcoma in dogs: a retrospective study of 169 cases (1986–1996). **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** 34:113–20.

Lavalle GE, Campos CB, Bertagnolli AC, et al. 2012. Canine malignant mammary gland neoplasias with advanced clinical staging with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. **In Vivo**. 26:375-379.

Leonessa F, Clarke R. 2003. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. **Endocr. Relat. Cancer**. 10:43-73.

Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, et al. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**. 438:803-819.

Liu W, Li J, Roth RA. 1999. Heregulin regulation of Akt protein kinase B in breast cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 261:897-903.

Liu L, Greger J, Shi H, et al. 2009. Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. **Cancer Res**. 69:6871-6878.

London CA, Hannah AL, Zadovoskaya R, et al. 2003. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. **Clin. Cancer Res**. 9:2755-2768.

London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, et al. 2009. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toracenib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine

kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. **Clin. Cancer Res.** 15:3856-3865.

Ma L, Pratt SE, Cao J, et al. 2002. Identification and characterization of the canine multidrug resistance-associated protein. **Mol. Cancer Ther.** 1:1335-1342.

Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, et al. 2003. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. **Blood.** 101:2368-2373.

Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, et al. 2000. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. **Blood.** 96:1070-1079.

Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, et al. 2001. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. **Cancer Res.** 61:3458-3464.

Marconato L, Gelain ME, Comazzi S. 2013. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. **Hematol. Oncol.** 31:1-9.

Martin de las Mulas J, Ordas J, Millan Y, et al. 2003. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **Breast Cancer Res. Treat.** 80:363-367.

Maser RS, de Pinho RA. 2002. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. **Science.** 297:565-569.

Matos AJF, Baptista CS, Gartner MF, et al. 2012. Prognostic studies of canine and feline mammary tumors: the need for standardized procedures. **Vet. J.** 193:24-31.

McCune BK, Earp HS. 1989. The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase in liver epithelial cells. The effect of ligand-dependent changes in cellular location. **J. Biol. Chem.** 264:15501-15507.

McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. **Endocr. Rev.** 20:321-344.

Melenhorst WB, Mulder GM, Xi Q, et al. 2008. Epidermal growth factor receptor signaling in the kidney: key roles in physiology and disease. **Hypertension**. 52:987-993.

Misdorp W, Else W, Hellmen E. 1999. **Histological classification of mammary tumors of the dog and cat**. WHO International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals. 2nd Series, Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology.

McCarthy EP, Burns RB, Freund KM, et al. 2000. Mammography use, breast cancer stage at diagnosis, and survival among older women. **J. Am. Geriatrics Soc.**, 48(10):1226-1233.

Menard S, Tagliabue E, Campiglio M, et al. 2000. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. **J. Cell. Physiol.** 182:150-162.

Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M. 2004. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. **Curr. Opin. Cell Biol.** 16:400-406.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**. 266:66-71.

Millanta F, Calandrella M, Bari G, et al. 2005. A comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. **Res. Vet. Sci.** 79:225-232.

Millanta F, Caneschi V, Ressel L, et al. 2010. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory carcinoma. **J. Comp. Pathol.** 142:36-42.

Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, et al. 2010. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. **Res. Vet. Sci.** 81:350-357.

Misdorp W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ. (Ed.) 2002. **Tumors in domestic animals**. 4^a ed. Cap. 12. pp. 575-606.

Miyake K, Mickley L, Litman T, et al. 1999. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. **Cancer Res.** 59:8-13.

Mizuno N, Suzuki M, Kusuha H, et al. 2004. Impaired renal excretion of 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole (E3040) sulfate in breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) knockout mice. **Drug Metab. Dispos.** 32:898-901.

Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, et al. 2001. The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells. **Cancer Res.** 61:7184-7188.

Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, et al. 2001. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Res.** 61:8887-8895.

Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, et al. 2004. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcomes in breast cancer: a validation study. **Mod. Pathol.** 17:1545-1554.

Mol JA, Selman PJ, Sprang EP, et al. 1997. The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 51:339-344.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, et al. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. **Cell.** 31:11-24.

Moll R, Krepler R, Franke WW. 1983. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. **Differentiation.** 23:256-269.

Morrison WB. 1998. Canine and feline mammary tumors. In: **Cancer in dogs and cats: medical and surgical management.** 1st ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. p. 591-598.

Motoyama AB, Lane HA. 2002. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. **Cancer Res.** 62:3151-3158.

Mukai M, Che XF, Furukawa T, et al. 2003. Reversal of the resistance to STI571 in human chronic myelogenous leukemia K562 cells. **Cancer Sci.** 94:557-563.

Murakami Y, Tateyama S, Rungsipipat A, et al. 2000. Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. **J. Vet. Med. Sci.** 62:743-750.

Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS. 1999. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. **Mol. Cell Biol.** 19:6845-6857.

Nahta R, Hung M-C, Hortobagyi GN, et al. 2006. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. **Nature Clin. Pract. Oncol.** 3:269-280.

Nakai E, Park K, Yawata T, et al. 2009. Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma. **Cancer Invest.** 27:901-908.

Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, et al. 1990. Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. **Int. J. Cancer.** 45:457-461.

Neve RM, Sutterlüty H, Pullen N, et al. Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. **Oncogene.** 19:1647-1656.

Nicholson RI, McClelland RA, Robertson JF, et al. 1999. Involvement of steroid hormone and growth factor crosstalk in endocrine response in breast cancer. **Endocr. Relat. Cancer.** 1999. 6:373-387.

Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD, et al. 2000. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathological associations and prognostic significance. **Vet. Pathol.** 37:239-247.

Nooter K, Brutel de la Riviere G, Look MP, et al. 1997. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. **Br. J. Cancer.** 76:486-493.

Nooter K, de la Riviere GB, Klijn J, et al. 1997. Multidrug resistance protein in recurrent breast cancer. **Lancet.** 349:1885-1886.

Nunoya K, Grant CE, Zhang D, et al. 2003. Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat multidrug resistance protein 1 (mrp1). **Drug Metab. Disp.** 31:1016-1026.

Ogilve GK, Moore AS. 1996. Mammary neoplasia. In: **Managing the veterinary cancer patient: a practice manual**. New Jersey: Veterinary Learning Systems Co. p. 431-433.

Osborne CK. 1998. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. **N. Engl. J. Med.** 1609-1618.

Osborne CK, Fuqua SA. 2000. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. **J. Clin. Oncol.** 18:3172-3186.

Ota S, Ishii G, Goto K, et al. 2009. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. **Lung Cancer.** 64:98-104.

Owen LN. 1979. A comparative study of canine and human breast cancer. **Invest. Cell Pathol.** 2:257-275.

Owen LN. 1980. **TNM Classification of tumors in domestic animals**. 1st ed. Geneva: World Health Organization.

Ozvegy-Laczka C, Hegedus T, Varady G, et al. 2004. High affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with ABCG2 multidrug transporter. **Mol. Pharmacol.** 65:1485-1495.

Paoloni MC, Khanna C. 2007. Comparative oncology today. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.** 37: 1023-1032.

Paoloni MC, Khanna C. 2008. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nat. Rev. Cancer.** 8:147-156.

Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, et al. 1980. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. **Cancer Res.** 40:2428-2432.

Parker MG. 1993. Steroid and related receptors. **Curr. Opin. Cell Biol.** 5:499-504.

Pawlowski KM, Mucha J, Majchrzak K, et al. 2013. Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells. **BMC Vet Res.** 9:19.

Peng X-X, Tiwari A-K, Wu H-C, et al. 2012. Overexpression of P-glycoprotein induces acquired resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia cells. **Chin. J. Cancer.** 31:110-118.

Pérez-Allenza MD, Rutteman GR, Peña L, et al. 1998. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **J. Vet. Intern. Med.** 12:132-139.

Pérez-Allenza MD, Peña L, Del Castillo N, et al. 2000. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. **J. Small Anim. Pract.** 41:287-291.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumors. **Nature.** 406:747-752.

Petterino C, Rossetti E, Bertoncetto D, et al. 2006. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (Clone C494) in canine mammary gland tumours. **J. Vet. Med. A.** 53:174-178.

Pierce JP, Natarajan L, Caan BJ, et al. 2007. Influence of a diet very high in vegetables, fruit, and fiber and low in fat on prognosis following treatment for breast cancer. **JAMA.** 298:289-298.

Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, et al. 2012. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Res.** 159:165-172.

Queiroga FL, Raposo T, Carvalho MI, et al. 2011. Canine mammary tumors as a model to study human breast cancer: most recent findings. **In vivo.** 455-456.

Rampaul RS, Pinder SE, Wencyk PM, et al. 2004. EGFR expression in operable breast cancer: is it of prognostic significance? **Clin. Cancer Res.** 10:2578.

Razandi M, Pedram A, Park ST, et al. 2003. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. **J. Biol. Chem.** 278:2701-2712.

Rees DC, Johnson E, Lewinson O. 2009. ABC transporters: the power to change. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 10:218-227.

Resser L, Millanta F, Poli A. 2011. Canine invasive lobular carcinoma of mammary gland: morphological and immunohistochemical characterizations of three cases. **J Comp Pathol.** 144:303-307.

Restucci B, Borzacchiello G, Maiolino P, et al. 2004. Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. **J. Comp. Pathol.** 130:99-104.

Restucci B, Papparella S, Maiolino P, et al. 2002. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. **Vet. Pathol.** 39:488-493.

Riedel H, Schlessinger J, Ulrich A. 1987. A chimeric, ligand-binding v-erbB/EGF receptor retains transforming potential. **Science.** 236:197-200.

Riordan JR, Ling V. 1979. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. **J. Biol. Chem.** 254:12701-12705.

Rivera P, Melin M, Biagi T, et al. 2009. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. **Cancer Res.** 69:8770-8774.

Robey RW, Medina-Perez WY, Nishiyama K, et al. 2001. Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1) in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. **Clin. Cancer Res.** 7:145-152.

Roskoski R. 2004. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 319:1-11.

Ross JS, Fletcher JA. 1998. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. **Stem Cell.** 16:413-428.

Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, et al. 2003. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer: biomarker and target of therapy. **Oncologist.** 8:307-325.

Rungsipipat A, Tateyama S, Yamaguchi R, et al. 1999. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. **J. Vet. Med. Sci.** 61:27-32.

Rutteman GR, Foekens JA, Portengen H, et al. 1994. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in non-affected and tumorous mammary tissue of female dogs. **Breast Cancer Res. Treat.** 30:139-146.

Sakorafas GH, Peros G. 2007. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: what a physician should know, a decade after its introduction in clinical practice. **Eur. J. Cancer Care.** 16:318-321.

Salgado BS, Monteiro LN, Colodel MM, et al. 2012. Cytologic and immunohistochemical features of a mammary invasive pleomorphic lobular carcinoma in a dog. **Comp. Clin. Pathol.** 21:495-499.

Salgado BS, Monteiro LN, Colodel MM, et al. 2013. Clinical, cytologic, and histologic features of a mammary micropapillary carcinoma in a dog. **Vet. Clin. Pathol.** 42:382-385.

Salgado BS, et al. 2015. Expression of multidrug resistance ATP-binding cassette (ABC) transporters in canine mammary tumors. **Adv. Breast Cancer Res.** Artigo aceito para publicação.

Sandusky GE, Mintze KS, Pratt SE, et al. 2002. Expression of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in normal tissues and carcinomas using tissue microarrays. **Histopathology.** 41:65-74.

Santos AAF, Oliveira JT, Lopes CCC, et al. 2010. Immunohistochemical expression. Of vascular endotelial growth fator in canine mammary tumors. **J. Comp. Pathol.** 143:268-275.

Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, et al., 2002. Prognostic value of histologic stage and proliferativa activity in canine malignant mammary tumors. **J. Vet. Diagn. Invest.** 14:25-34.

Sartin EA, Barnes S, Kwapien RP, et al. 1992. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. **Am. J. Vet. Res.** 53:2196-2200.

Sartor CI, Zhou H, Kozłowska E, et al. 2001. HER4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells. **Mol. Cell Biol.** 21:4265-4275.

Sassi F, Benazzi C, Castellani G, et al. 2010. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC Vet. Res.** 6:5.

Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, et al. 1985. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. **Science.** 229:976-978.

Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. 1969. Factors influencing canine mammary cancer development and post-surgical survival. **J. Natl. Cancer Inst.** 43:1249-1261.

Schreier B, Rabe S, Schneider B, et al. 2013. Loss of epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes causes arterial hypotension and cardiac hypertrophy. **Hypertension.** 61:333-340.

Scully R, Chen J, Ochs RL, et al. 1997. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. **Cell.** 90:425-235.

Serra V, Markman B, Scaltriti M, et al. 2008. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. **Cancer Res.** 68:8022-8030.

Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. 2014. Cancer Statistics. **CA Cancer J. Clin.** 64:9-29.

Singer J, Weichselbaumer M, Stockner T, et al. 2012. Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. **Mol. Immunol.** 50:200-209.

Singer J, Fazekas J, Weichselbaumer M, et al. 2014. Generation of a canine anti-EGFR (ErbB-1) antibody for passive immunotherapy in dog cancer patients. **Mol. Cancer. Ther.** 13:1777.

Sharom FJ. 2008. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. **Pharmacogenomics.** 9:105-127.

Shinoda H, Legare ME, Mason GL, et al. 2014. Significance of ER α , HER2, and CAV1 expression and molecular subtype classification to canine mammary gland tumor. **J. Vet. Diagn. Invest.** 26:390-403.

Shou J, Massarweh S, Osborne CK, et al. 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. **J. Natl. Cancer. Inst.** 96:926-935.

Silva ILD, Dias APM, Bertagnolli AC, Cassali GD, Ferreira E. 2014. Analysis of EGFR and HER-2 expressions in ductal carcinomas in situ in canine mammary glands. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 66:763-768.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SC, et al. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. **Science**. 235:177-182.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**. 244:707-712.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against Her2 for metastatic breast cancer that overexpresses Her2. **N. Eng. J. Med.** 344:783-792.

Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, et al. 1999. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). **Semin. Oncol.** 26:60-70.

Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW. 1997. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxitamoxifen. **Mol. Endocr.** 11:657-666.

Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, et al. 2012. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. **Chin. J. Cancer**. 31:58-72.

Song RX, McPherson RA, Adam L, et al. 2002. Linkage of rapid estrogen to MAPK activation by ER alpha-Shc association and Shc pathway activation. **Mol. Endocr.** 16:116-127.

Sonnenschein EG, Glickman LT, Goldschmidt MH, et al. 1991. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. **Am. J. Epidemiol.** 133:694-703.

Sorenmo K, Shofer FS, Goldschmidt MH. 2000. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. **J. Vet. Intern. Med.** 14:266-270.

Sorenmo K. 2003. Canine mammary gland tumors. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.** 33:573-596.

Sorenmo KU, Rasotto R, Zapulli V, et al. 2011. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Vet. Pathol.** 48:85-97.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumors subclasses with clinical implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 98:10869-10874.

Sorlie T. 2004. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **Eur. J. Cancer.** 40:2667-2675.

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. 2003. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population based study. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 100:10393-10398.

Srinivasan R, Poulsom R, Hurst HC, et al. 1998. Expression of the c-erbB-4/HER4 protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumor types. **J. Pathol.** 185:235-245.

Steingold SF, Sharp NJ, McGahan MC, et al. 1998. Characterization of canine MDR1 mRNA: its abundance in drug resistant cell lines and in vivo. **Anticancer Res.** 18:393-400.

Stride BD, Grant CE, Loe DW, et al. 1997. Pharmacological characterization of the murine and human orthologs of multidrug-resistance protein in transfected human embryonic kidney cells. **Mol. Pharmacol.** 52:344-353.

Suami H, Yamashita S, Soto-Miranda MA, et al. 2013. Lymphatic territories (lymphosomes) in a canine: an animal model for investigation of postoperative lymphatic alterations. **PLoS One.** 8:e69222:

Sugiura T, Matsuyama S, Akiyoi H, et al. 2007. Expression patterns of the BRCA1 splicing variants in canine normal tissues and mammary gland tumors. **J. Vet. Med. Sci.** 69:587-592.

Sun S-S, Hsieh J-F, Tsai S-C, et al. 2000. Expression of mediated P-glycoprotein multidrug resistance related to Tc-99m MIBI scintimammography results. **Cancer Lett.** 153:95-100.

Suo Z, Risberg B, Kalsson MG, et al. EGFR family expression in breast carcinomas: c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. **J. Pathol.** 196:17-25.

Suvannasankha A, Minderman H, O'Loughlin KL, et al. 2004. Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in acute myeloid leukemia: discordance between expression and function. **Leukemia.** 18:1252-1257.

Suzuki E, Niwa R, Saji S, et al. 2007. A nonfucosylated anti-HER2 antibody augments antibody-dependent cellular cytotoxicity in breast cancer patients. **Clin. Cancer Res.** 13:1875-1882.

Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, et al. 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nat. Rev. Drug Discov.** 5:219-234.

Taguchi Y, Saeki K, Komano T. 2002. Functional analysis of MRP1 cloned from bovine. **FEBS. Lett.** 521:211-213.

Tang CK, Goldstein DJ, Payne J, et al. 1998. ErbB-4 ribozymes abolish neuregulin-induced mitogenesis. **Cancer Res.** 58:3415-3422.

Tang P, Wang J, Bourne P. 2008. Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same? **Hum. Pathol.** 39:506-513.

Taniguchi K, Wada M, Kohno K, et al. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cell lines with decreased drug accumulation. **Cancer Res.** 56:4124-4129.

Teng S-H, Hsu W-L, Chiu C-Y, et al. 2012. Overexpression of P-glycoprotein, STAT3, phosphor-STAT3 and KIT in spontaneous canine cutaneous mast cell tumours before and after prednisolone treatment. **Vet. J.** 193:551-556.

ter Beek J, Guskov A, Slotboom DJ. 2014. Structural diversity of ABC transporters. **J. Gen. Physiol.** 143:419-435.

Terragni R, Gardini AC, Sabattini S, et al. 2014. EGFR, HER-2 and KRAS in canine gastric epithelial tumors: a potential human model? **PLoS One.** 9:1-7.

Tian C, Ambrosone CB, Darcy KM, et al. 2012. Common variants in ABCB1, ABCC2 and ABCG2 genes and clinical outcomes among women with advanced stage ovarian cancer treated with platinum and taxane-based chemotherapy: a Gynecologic Oncology Group study. **Gynecol. Oncol.** 124:575-581.

Toh S, Wada M, Uchiumi T, et al. 1999. Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding cassette region in Dubin-Johnson syndrome. **Am. J. Hum. Genet.** 64:739-746.

Toyoshima H, Hunter T. 1994. P27, a novel inhibitor of g1 cyclin-cdk-protein-kinase activity, is related to p21. **Cell**. 78:67-74.

Tsongalis GJ, Ried A Jr. 2001. HER2: the neu prognostic marker for breast cancer. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci**. 38:167-182.

Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. 1997. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. **J. Natl. Cancer Inst**. 89:917-931.

Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, et al. 2002. Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat**. 71:67-75.

Tzahar E, Waerman H, Chen X, et al. 1996. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. **Mol. Cell Biol**. 16:5276-5287.

Ueda K, Matsuo M, Tanabe K, et al. 1999. Comparative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins. **Biochim. Biophys. Acta**. 1461:305-313.

Ushijima R, Takayama K, Izumi M, et al. 2007. Immunohistochemical expression of MRP2 and clinical resistance to platinum-based chemotherapy in small cell lung cancer. **Anticancer Res**. 27:4351-4358.

Vail DM, MacEwen EG. 2000. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. **Cancer Invest**. 18:781-792.

van den Elsen JMH, Kuntz DA, Hoedemaeker FJ, et al. 1999. Antibody C219 recognizes an alpha-elical epitope on P-glycoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 96:13679-13684.

van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**. 415:530-536.

Venkitaraman AR. 2002. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**. 108:171-182.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. 2002. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. **J. Clin. Oncol.** 20:719-726.

Volk EL, Rohde K, Rhee M, et al. 2000. Methotrexate cross-resistance in a mitoxantrone selected multidrug-resistant MCF7 breast cancer cell line is attributable to enhanced energy-dependent drug efflux. **Cancer Res.** 60:3514-3521.

Vousden KH, Prives C. 2009. Blinded by the light: the growing complexity of p53. **Cell.** 137:413-431.

Wada M, Toh S, Taniguchi K, et al. 1998. Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. **Hum. Mol. Genet.** 7:203-207.

Walker JR, Saraste M, Runswick MJ, et al. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **EMBO. J.** 1:945-951.

Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, et al. 2002. Gene expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node negative primary breast cancer. **Lancet.** 365:671-679.

Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, et al. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. **Cancer Cell.** 10:25-38.

Weinberg RA. 2014. **The Biology of Cancer.** 2nd ed. Nova Iorque: Garland Science. 960 p.

Weiner LM, Adams GP. 2000. New approaches to antibody therapy. **Oncogene.** 19:6144-6151.

Wenzell JJ, Piehler A, Kaminski WE. 2007. ABC A-subclass proteins: gatekeepers of cellular phosphor- and sphingo-lipid transport. **Front. Biosci.** 12:3177-3193.

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. 2010. **Continuous update report summary: food, nutrition, physical activity and the prevention of breast cancer.**

White RR, Stanley WE, Johnson JL, et al. 2002. Long-term survival in 2,505 patients with melanoma with regional lymph node metastasis. **Ann. Surg.** 235:879–887

Whiteakers JR, Zhang H, Zhao L, et al. 2007. Integrated pipeline for mass spectrometry-based discovery and confirmation of biomarkers demonstrated in a mouse model of breast cancer. **J. Proteome Res.** 6:3962-3975.

Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, et al. 2003. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. **J. Pathol.** 200:290-297.

Yanase K, Tsukahara S, Asada S, et al. 2004. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. **Mol. Cancer Ther.** 3:1119-1125.

Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K. 1996. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on the TNM and histologic classification. **J. Vet. Med. Sci.** 58:1079–83.

Yarden Y, Sliwkowski MX. 2001. Untangling the ErbB signaling network. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** 2:127-137.

Young LC, Campling BG, Cole SP, et al. 2001. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. **Clin. Cancer Res.** 7:1798-1804.

Zhang XW, Gureasko J, Shen K, et al. 2006. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. **Cell.** 125:1137-1142.

Zhang L, Castanaro C, Luan B, et al. 2014. ERBB3/HER2 signaling promotes resistance to EGFR blockade in head and neck and colorectal cancer models. **Mol. Cancer Ther.** 13:1-11.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side population phenotype. **Nat. Med.** 7:1028-1034.

Zhou W, Carpenter G. 2002. ErbB-4: a receptor tyrosine kinase. **Inflamm. Res.** 51:91-101.

ANEXO I – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Expression of multidrug resistance ATP-binding cassette (ABC) transporters in canine mammary tumors

Breno S. Salgado^{1,2*}, Suely Nonogaki³, Luisa M. Soares⁴, Angela Akamatsu⁵, Cristiano R. N. da Silva⁵, Thiago P. Anacleto⁵, Rodolfo Malagó⁵, Rafael M. Rocha³, Fátima Gärtner², Noeme S. Rocha^{1,4}

1: Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Univ. Estadual Paulista, Campus de Botucatu. Botucatu, Brazil.

2: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (Intitute of Biomedical Sciences Abel Salazar of University of Porto). Oporto, Portugal.

3: Fundação Antônio Prudente, Hospital A.C. Camargo. São Paulo, Brazil.

4: Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista, UNESP. Botucatu, Brazil.

5: Hospital Escola de Medicina Veterinária, Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá – FEPI. Itajubá, Brazil

Email: brenosalgado@globocom

Copyright © 2015 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

How to cite this paper: Salgado, B.S., Nonogaki, S., Soares, L.M., et al (2015) Expression of multidrug resistance ATP-binding cassette (ABC) transporters in canine mammary tumors. *****, *, **_*. http://dx.doi.org/10.4236/abcr.2015.*****

Mammary neoplasms are the most common tumors in female dogs. They are usually treated using solely surgical mastectomy – which is recognized as unsatisfactory in many cases. Given this, the benefits of chemotherapy in dogs with mammary cancer need to be further explored. Some drugs that can be used for treating canines with mammary tumors may be substrates of uptake and/or efflux transporters such as the ATP-binding cassette (ABC) transporters. Unfortunately, very little is known regarding the pathobiology of such proteins in canine tumors, including mammary cancer. Accordingly, this study was designed to characterize the expression of ABC transporters P-glycoprotein, MRP1, and MRP2 and its relation with clinicopathologic factors in order to allow a better understanding of their influence in canine mammary cancer. P-glycoprotein was expressed in tumors from 55.8% of patients, while MRP1 and MRP2 were expressed in 37.2 and 39.5% of tumors, respectively. P-glycoprotein expression showed to be related with regional lymph node spread ($P = 0.0038$), as well as with tumor grade ($P = 0.0353$) and with a shorter survival ($P = 0.0245$). MRP1 revealed a strong association with a higher histological grade ($P < 0.0001$) and overall survival ($P = 0.0002$). Additionally, MRP1 was determined as prognostic indicator independent of lymph node status using Cox proportional-hazards regression multivariate analysis ($P = 0.0216$). No relations between MRP2 and clinicopathologic features were observed. We have found that P-glycoprotein and MRP1 are expressed in highly aggressive canine mammary tumors and are related with poor prognosis. Our results suggest that they may play a significant role in the course of canine mammary cancer progression and be promising candidate markers for a validation study on therapy outcome.

Keywords

MDR1, P-gp, MRP1, MRP2, ABCC2, mammary neoplasms, prognosis, dog.

1. Introduction

Mammary tumors represent the most common neoplasm in intact female dogs and approximately half are considered as malignant. Canine mammary carcinomas (CMCs) have heterogeneous features that make it difficult to determine patient prognosis [1,2]. Studies regarding mammary tumors in dogs aimed at defining a more precise prognosis by evaluating different tumor characteristics such as oncogenes/oncoproteins [3,4] and tumor growth or suppression related features [5,6]. However, despite the many achievements regarding the understanding of CMCs pathobiology much remains unknown.

Treatment for canine mammary tumors usually is restricted to surgical mastectomy – which is recognized as unsatisfactory in many cases [2]. However, there are neither studies with large case series that prove the benefits of chemotherapy for canine cancer nor consensus on which drugs must or may be used. Since different individuals with a similar disease may present different responses to the same drugs due to individual aspects, it is important to understand which cellular components of tumor cells can interfere in drug response. In humans much has been learned about ATP-binding cassette (ABC) transporters, with different cancers presenting with alterations in such cellular components, leading to failure of cancer chemotherapy [7-11]. Initially discovered as chemotherapeutic drug-efflux pumps, ATP-binding cassette (ABC) superfamily of transporters represents the largest family of transmembrane proteins [9]. ABC transporters facilitate translocation of heterogeneous substrates including metabolic products,

lipids and sterols, peptides and proteins, saccharides, amino acids, inorganic and organic ions, metals, and drugs across the membrane by using energy from ATP hydrolysis [12].

Since the concept of personalized medicine is being progressively applied to veterinary medicine we can expect that ABC superfamily members may be increasingly evaluated in small animal oncology in a near future in order to promote a more accurate treatment. However, it is not widely understood whether ABC superfamily members have an influence on canine mammary tumors' pathobiology. Accordingly, in this study we aimed to evaluate the immunoexpression of ABC superfamily members in CMCs in order to address their potential prognostic implications in such tumors.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

A prospective series of 43 cases of primary canine mammary tumors in adult females presenting from 2011 to 2013 was used. Surgical specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin wax. Sections (3 μ m thick) were obtained and stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological examination.

2.2. Follow-up

Patients were followed up for a period of 18 months and overall survival was taken as the time (in months) from the date of the primary surgical treatment to the time of death.

2.3. Histopathological evaluation

Tumors were classified according to the World Health Organization (WHO) criteria for canine mammary neoplasms [1]. Histological grade [13] and lymph node status were also evaluated.

2.4. Immunohistochemistry

For ABC transporter proteins, 3 μ m thick histologic sections were obtained, deparaffinized, and rehydrated. Immunohistochemistry was performed by using a polymeric labeling detection system (Novolink Polymer Detection System, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK). Antigen retrieval was carried out by heat treatment in 10 mM citrate buffer pH 6.0 for all primary antibodies. Subsequent endogen peroxidase and protein blockages were performed according manufacturers' instructions. All slides were then overnight incubated at 4°C with the specific primary antibodies. Then, the slides were immersed with the detection systems following the manufacturer's instructions. Subsequently, 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) was used as chromogen in order to allow the visualization of antigen-antibody reaction. Slides were counterstained using Harris's hematoxylin, dehydrated, and mounted for evaluation and light microscopy. Antibodies data are presented at table 1. All series included know positive cases as positive controls. Negative controls included replacement of the primary antibodies with non-reacting antibodies of the same subclass.

Table 1. Primary antibodies used for ABC superfamily immunohistochemistry.

Antibody	Source	Manufacturer	Dilution	Clone
P-glycoprotein	Mouse	Dako	1:100	C494
MRP1	Mouse	Enzo LifeScience	1:200	MRPm6
MRP2	Mouse	Enzo LifeScience	1:200	M ₂ III-6

MRP1, multidrug resistance-associated protein 1; *MRP2*, multidrug resistance-associated protein 2.

Samples were defined as positive when more than 10% of cells revealed immunoreactivity. Slides were evaluated by two independent observers blinded to patient characteristics and outcome. All cases with discrepant results were discussed during observation with a double-headed microscope, and a consensus was reached.

2.4. Statistical Analysis

Associations between the expression of the different ABC superfamily proteins and with clinicopathologic features were assessed by using Fisher's exact test when compared variables had exactly two groups (2 x 2 contingency tables), such as LN status (positive or negative), and by using the χ^2 test for categorical variables such as histological grade and tumor histotype. Survival curves were estimated using Kaplan-Meier product-limit method, and the significance of differences between survival curves was determined using the log rank test. Multivariate analysis was performed by Cox proportional hazards regression modeling. All statistical tests were two sided, and statistical significance was accepted at the $P < 0.05$ level. All analyses were performed using the Prism GraphPad software version 5.0 (San Diego, CA).

3. Results

P-glycoprotein and MRP1 expression was mainly membranous but frequently associated with cytoplasmic positivity, whereas MRP2 expression was weak and mainly cytoplasmic. In all cases they were consistently expressed by luminal mammary cells (figure 1). No associations were observed between ABC transporters and tumor histotype. A positive association between P-glycoprotein and lymph node status ($P = 0.0038$) was found, as well as with tumor grade ($P = 0.0353$). MRP1 revealed a strong association with a higher histological grade ($P < 0.0001$). No relations between MRP2 and clinicopathologic features were observed. Results regarding tumor types, histological grade, and lymph node status according to P-glycoprotein, MRP1, and MRP2 expression are summarized in table 2.

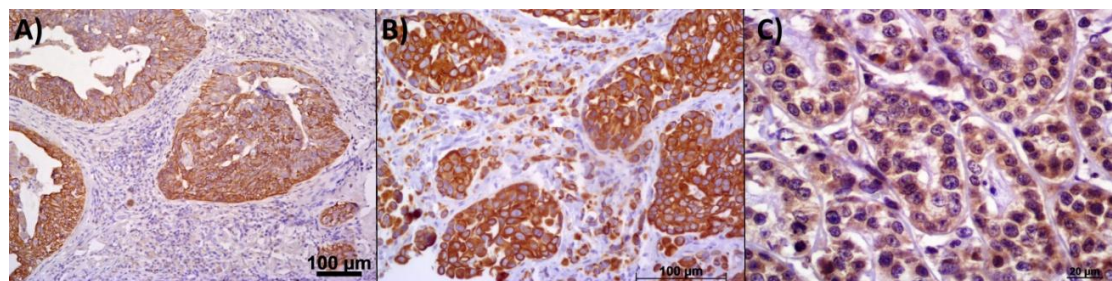


Figure 1. Canine mammary gland carcinomas revealing expression of ABC transporters. (A) Note the P-glycoprotein expression in luminal cells across the membrane and slighter in the cytoplasm. (B) MRP1 strong expression in a mammary tumor with membrane and cytoplasm intense reactivity. (C) MRP2 expression mainly in the cytoplasm of luminal cells.

Table 2. Patients' clinicopathologic characteristics according to ABC transporter protein expression.

Clinical parameters	P-glycoprotein					MRP1					MRP2				
	Positive		Negative		P value	Positive		Negative		P value	Positive		Negative		P value
	N	%	N	%		N	%	N	%		N	%	N	%	
Tumor type															
Tubulo-papillary carcinoma	10	23.3	11	25.6	0.9044	14	32.5	7	16.3	0.112	12	30.3	9	20.9	0.6727
Complex carcinoma	5	11.6	6	13.9		7	16.3	4	9.3		7	16.3	4	9.3	
Carcinoma in mixed tumor	3	7.2	6	13.9		4	9.3	5	11.6		5	11.6	4	9.3	
Others	1	2.3	1	2.3		2	4.7	0	-		2	4.7	0	-	
Histological grade															
I	11	25.6	16	37.2	0.0353	0	-	27	62.8	< 0.0001	12	27.9	15	34.9	0.5721
II	9	20.9	2	4.7		11	25.6	0	-		4	9.3	7	16.3	
III	4	9.3	1	2.3		5	11.6	0	-		1	2.3	4	9.3	
LN status															
+	10	23.3	0	-	0.0038	6	13.9	4	9.3	0.2402	4	9.3	6	13.9	0.1627
-	14	32.5	19	44.2		10	23.3	23	53.5		12	30.3	20	46.5	

N, number; *LN*, lymph node; *MRP1*, multidrug resistance-associated protein 1; *MRP2*, multidrug resistance-associated protein 2

3.1. Association between ABC transporters and survival

Overall patient survival rates were determined using the log rank test with respect to expression of ABC transporters. P-glycoprotein was found to be significantly associated with a poor outcome ($P = 0.0245$) (figure 2A), as well as MRP1 ($P = 0.0002$) (Figure 2B). However, no significant difference in patient outcome was found with respect to MRP2 (figure 2C) ($P = 0.2548$). Additionally, MRP1 was determined as prognostic indicator independent of lymph node status using Cox proportional-hazards regression multivariate analysis ($P = 0.0216$).

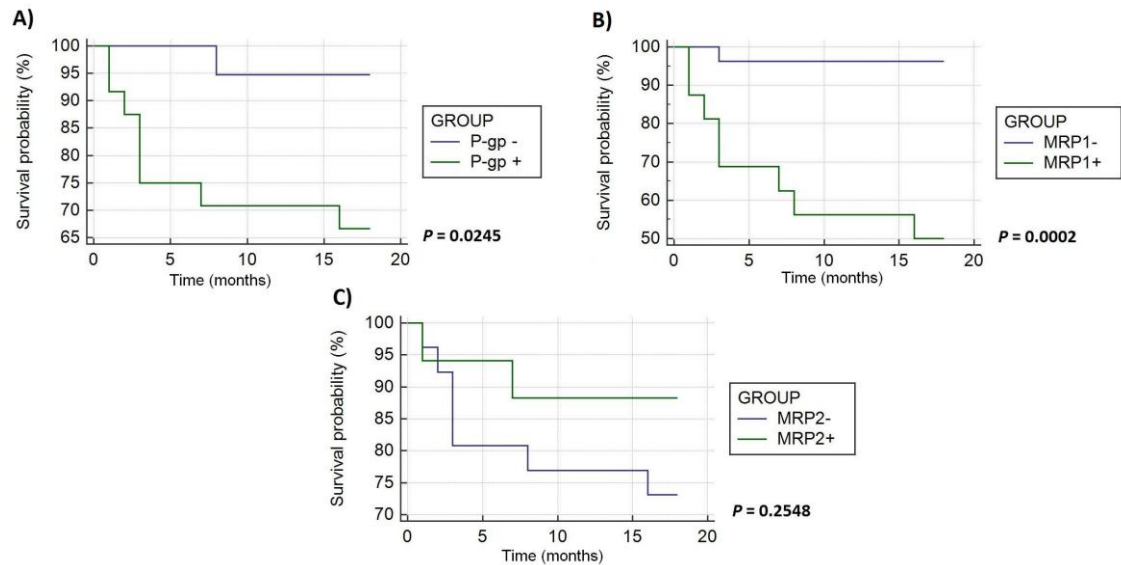


Figure 2. Survival curves and expression of ABC transporters (A) P-glycoprotein, (B) MRP1, and (C) MRP2.

4. Discussion

Several ABC transporters are implicated in multidrug resistance and are recognized causes for failure of cancer chemotherapy [7-11]. This is the case of ATP-dependent drug efflux transporter P-glycoprotein (P-gp or ABCB1) whose expression on tumor cells has been identified to be a well-recognized mechanism of cancer multidrug resistance by decreasing intracellular drug accumulation [9].

In the cases herein studied, ABC transporters expression was confined to mammary luminal cells. Other authors [14] revealed immunoexpression of P-glycoprotein in myoepithelial cells, differently from what was observed in this study. This feature probably occurred due to the use of the C219 clone by such authors – an antibody clone which is known to display cross-reactivity with a number of other proteins [15]. In order to avoid such cross-reaction, we used a more specific clone in order to produce more accurate results.

This study addressed the potential prognostic role of ABC transporters P-glycoprotein, MRP1, and MRP2 in a series of 43 canine mammary tumors. Given the function of drug

transporters and their capability to extrude toxins, drugs, and physiological substrates from cells [16], a clear definition of their prognostic role is not straightforward to achieve. A possible

role of ABC transporters protein expression in canine mammary cancer has previously been studied [6,14,17], but the results are not conclusive. In humans, data are also controversial. Some authors reported a loss of MRP1 expression in poorly differentiated histology cases, suggesting that MRP1 loss is associated with loss of differentiation [18,19]. In contrast, an association of MRP1 and MDR1/P-gp increase with tumor stage has also been suggested [20-22], similarly to what was observed in this study and consequently suggesting that MRP1 and P-glycoprotein expression have an implication in disease outcome.

MRP1 and MDR1 have been shown to confer multidrug resistance in vitro in human cancer cell lines [23-25] and also in canine mammary cell lines [26]. Additionally, they were shown to be associated with poor patient outcomes and/or chemoresistance in different canine tumor types [27,28] including mammary tumors [6]. In the present study, we have analyzed the protein levels of MDR1/P-gp, MRP1, and MRP2 and found that P-gp and MRP1 levels were higher in tumors with higher histological grade and regional lymph node metastasis, as well as an association with shorter survival, in line with results which characterized P-gp as a prognostic indicator in canine mammary tumors [6].

A number of studies have been carried out on the changes in MRP2 expression in human tumors including colorectal carcinoma [29], lung [30], and breast [31] cancers, which might be associated with their resistance to chemotherapeutic agents. Since MRP2 is involved in the efflux of various anti-neoplastic agents, these findings can indicate that neoplastic cells can acquire drug resistance through the increased MRP2 activity. Since there are no data regarding the expression of MRP2 in canine mammary tumors, it is not possible to directly relate such ABC transporter with drug resistance in the species. When it comes to prognosis, we found no relation of MRP2 with clinicopathologic features. This is in line with studies which evaluated MRP2 expression in human cancers [32,33].

Overall, our results suggest that P-glycoprotein and MDR1 not only be promising candidate markers for a validation study on therapy outcome but also they may play a significant role in the course of canine mammary cancer progression.

Acknowledgements

B.S.S. thanks the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil, for financial support and Cleuso Cesário for his help with technical issues.

References

- [1] Misdorp, W. (2001) Tumors of the mammary gland. In: Meuten, D.J., Ed., *Tumors in Domestic Animals*, Blackwell Publishing Company, Ames, 75-606.
- [2] Lana, S.E., Rutteman, G.R., Withrow, S.J. (2007) Tumors of the mammary gland. In: Withrow, S.J., Vail, D.M., Eds., *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4th ed., Saunders Elsevier, St. Louis, 619-638.
- [3] Gama, A., Gärtner, F., Alves, A., Schmitt, F. (2009) Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, **87**, 432-437. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.04.016>
- [4] Terragni, R., Gardini, A.C., Sabattini, S., Bettini, G., Amadori, D., Talamonti, C., Vignoli, M., Capelli, L., Saunders, J.H., Ricci, M., Ulivi, P. (2014) EGFR, HER-2 and KRAS in canine gastric epithelial tumors: a potential human model? *PLoS ONE*, **9**, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085388>
- [5] Lee, C.-H., Kim, W.-H., Lim, J.-H., Kang, M.-S., Kim, D.-Y., Kweon, O.-K. (2004) Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, **5**, 63-69. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.66.63>

-
- [6] Koltai, Z., Valjdovich, P. (2014) Expression of multidrug resistance membrane transporter (Pgp) and p53 protein in canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Hungarica*, **2**, 194-204. <http://dx.doi.org/10.1556/AVet.2014.002>
- [7] Trock, B.J., Leonessa, F., Clarke, R. (1997) Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *The Journal of the National Cancer Institute*, **89**, 917-931. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/89.13.917>
- [8] Abolhoda, A., Wilson, A.E., Ross, H., Danenberg, P.V., Burt, M., Scotto, K.W. (1999) Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clinical Cancer Research*, **5**, 3352-3356.
- [9] Wenzel, J.J., Piehler, A., Kaminski, W.E. (2007) ABC A-subclass proteins: gatekeepers of cellular phospho- and sphingolipid transport. *Frontiers in Bioscience*, **12**, 3177-3193. <http://dx.doi.org/10.2741/2305>
- [10] Amiri-Kordestani, L., Basseville, A., Kurdziel, K., Fojo, A.T., Bates, S.E. (2012) Targeting MDR in breast and lung cancer: Discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. *Drug Resistance Updates*, **15**, 50-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2012.02.002>
- [11] Hedditich, E.L., Gao, B., Russel, A.J., Lu, Y., Emmanuel, C., Beesley, J., Johnatty, S.E., Chen, X., Harnett, P., George, J., Williams, R.T., Flemming, C., Lambrechts, D., Despierre, E., Lambrechts, S., Vergote, I., Karlan, B., Lester, J., Orsulic, S., Walsh, C., Fasching, P., Beckmann, M.W., Ekici, A.B., Hein, A., Matsuo, K., Hosono, S., Nakanishi, T., Yatabe, Y., Pejovic, T., Bean, Y., Heitz, F., Harter, P., Du Bois, A., Schwaab, I., Hogdall, E., Kjaer, S.K., Jensen, A., Hogdall, C., Lundvall, L., Engelholm, S.A., Brown, B., Flanagan, J., Metcalf, M.D., Siddiqui, N., Sellers, T., Fridley, B., Cunningham, J., Schidkraut, J., Iversen, E., Weber, R.P., Berchuck, A., Goode, E., Bowtee, D.D., Chenevix-Trench, G., Defazio, A., Norris, M.D., Macgregor, S., Haber, M., Henderson, M.J. (2014) ABCA transporter gene expression and poor outcome in epithelial ovarian cancer. *The Journal of the National Cancer Institute*, **7**, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/dju149>
- [12] Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*, **8**, 67-113. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.000435>
- [13] Elston, C.W., Ellis, I.O. (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, **19**, 403-410. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>
- [14] Kim, N.-H., Hwang, Y.-H., Im, K.-S., Kim, J.-H., Chon, S.-K., Kim, H.-Y., Sur, J.-H. (2012) P-glycoprotein expression in canine mammary gland tumours related with myoepithelial cells. *Research in Veterinary Science*, **93**, 1346-1352. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.04.004>
- [15] van den Elsen, J.M.H., Kuntz, D.A., Hoedemaeker, F.J., Rose, D.R. (1999) Antibody C219 recognizes an alpha-helical epitope on P-glycoprotein. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 13679-84. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.24.13679>
- [16] Fletcher, J.I., Haber, M., Henderson, M.J., Norris, M.D. (2010) ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer*, **10**, 147-156. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2789>
- [17] Petterino, C., Rossetti, E., Bertonecello, D., Martini, M., Zappulli, V., Bargelloni, L., Castagnaro, M. (2006) Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (Clone C494) in canine mammary gland tumours. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, **53**, 174-178. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0442.2006.00810.x>
- [18] Beck, J., Bohnet, B., Brugger, D., Bader, P., Dietl, J., Scheper, R.J., Kandolf, R., Liu, C., Niethammer, D., Gekeler, V. (1998) Multiple gene expression analysis reveals distinct differences between G2 and G3 stage breast cancers and correlations of PKC eta with MDR1, MRP and LRP gene expression. *British Journal of Cancer*, **77**, 87-91. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.1998.13>
- [19] Ferrero, J.M., Etienne, M.C., Formento, J.L., Francoual, M., Rostagno, P., Peyrottes, I., Ettore, F., Teissier, E., Leblanc-Talent, P., Namer, M., Milano, G. (2000) Application of an original RT PCR-ELISA multiplex assay for MDR1 and MRP, along with p53 determination in node-positive breast cancer patients. *British Journal of Cancer*, **82**, 171-177.
- [20] Filipitis, M., Suchomel, R.W., Dekan, G., Haider, K., Valdimarsson, G., Depisch, D., Pirker, R. (1996) MRP and MDR1 gene expression in primary breast carcinomas. *Clinical Cancer Research*, **2**, 1231-1237. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8049\(96\)84850-7](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8049(96)84850-7)
- [21] Nooter, K., Brutel de la Riviere, G., Look, M.P., van Wingerden, K.E., Henzen-Logmans, S.C., Scheper, R.J., Flens, M.J., Klijn, J.G., Stoter, G., Foekens, J.A. (1997) The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *British Journal of Cancer*, **76**, 486-493. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.1997.414>
- [22] Sun, S.-S., Hsieh, J.-F., Tsai, S.-C., Ho, Y.-J., Lee, J.-K., Kao, C.-H. (2000) Expression of mediated P-glycoprotein multidrug resistance related to Tc-99m MIBI scintimammography results. *Cancer Letters*, **153**, 95-100. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00356-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00356-6)
- [23] Goto, H., Keshelava, N., Matthay, K.K., Lukens, J.N., Gerbing, R.B., Stram, D.O., Seeger, R.C., Reynolds, C.P.

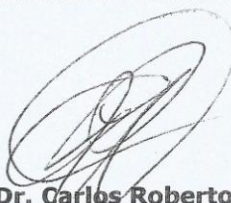
- (2000) Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) expression in neuroblastoma cell lines and primary tumors. *Medical and Pediatric Oncology*, **35**, 619-622.
[http://dx.doi.org/10.1002/1096-911X\(20001201\)35:6<619::AID-MPO28>3.0.CO;2-H](http://dx.doi.org/10.1002/1096-911X(20001201)35:6<619::AID-MPO28>3.0.CO;2-H)
- [24] Ferreira, M.J.U., Gyemant, N., Madureira, A.M., Tanaka, M., Koos, K., Didziapetris, R., Molnar, J. (2005) The effects of jatrophone derivatives on the reversion fo MDR1- and MRP-mediated multidrug resistance in the MDA-MB-231 (HTB-26) cell line. *Anticancer Research*, **25**, 4173-4178.
- [25] Nakai, E., Park, K., Yawata, T., Chihara, T., Kumazawa, A., Nakabavashi, H., Shimizu, K. (2009) Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma. *Cancer Investigation*, **27**, 901-908. <http://dx.doi.org/10.3109/07357900801946679>
- [26] Pawlowski, K.M., Mucha, J., Majchrzak, K., Motyl, T., Król, M. (2013) Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells. *BMC Veterinary Research*, **9**, 119. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-9-119>
- [27] Gaspar, L.F.J., Ferreira, I., Colodel, M., Brandão, C.V.S., Rocha, N.S. (2010) Spontaneous canine transmissible venereal tumor: cell morphology and influence on P-glycoprotein expression. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, **34**, 447-454.
- [28] Teng, S.-H., Hsu, W.-L., Chiu, C.-Y., Wong, M.-L., Chang, S.-C. (2012) Overexpression of P-glycoprotein, STAT3, phospho-STAT3 and KIT in spontaneous canine cutaneous mast cell tumours before and after prednisolone treatment. *The Veterinary Journal*, **193**, 551-556. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.01.033>
- [29] Hinoshita, E., Uchiumi, T., Taguchi, K., Kinukawa, N., Tsuneyoshi, M., Maehara, Y., Sugimachi, K., Kuwano, M. (2000) Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clinical Cancer Research*, **6**, 2401-2407.
- [30] Young, L.C., Campling B.G., Cole, S.P., Deeley, R.G., Gerlach, J.H. (2001) Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clinical Cancer Research*, **7**, 1798-1804
- [31] Choi, H.-K., Yang, J.-W., Roh, S.-H., Han, C.-Y., Kang, K.-W. (2007) Induction of multidrug resistance associated protein 2 in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, **14**, 293-303. <http://dx.doi.org/10.1677/ERC-06-0016>
- [32] Ota, S., Ishii, G., Goto, K., Kubota, K., Kim, Y.-H., Kojika, M., Murata, Y., Yamazi, M., Nishiwaki, Y., Eguchi, K., Ochiai, A. (2009) Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. *Lung Cancer*, **64**, 98-104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.07.014>
- [33] Tian, C., Ambrosone, C.B., Darcy, K.M., Krivak, T.C., Armstrong, D.K., Bookman, M.A., Davis, W., Zhao, H., Moysich, K., Gallion, H., DeLoia, J.A. (2012) Common variants in ABCB1, ABCC2 and ABCG2 genes and clinical outcomes among women with advanced stage ovarian cancer treated with platinum and taxane-based chemotherapy: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology*, **124**, 575-581. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.11.022>

**ANEXO II – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Análise da expressão de MDRI, MRPI, MRP2 e da superfamília EGFR nos carcinomas mamários esporádicos de cadelas**", Protocolo nº 73/2011-CEUA, de **Breno Souza Salgado**, aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina, Doutorado, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 01 de abril de 2011.



Prof. Ass. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

**APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO
LIVRE E ESCLARECIDO**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do procedimento MASTECTOMIA RADICAL UNILATERAL, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado Análise da expressão de MDR1, MRP1, MRP2 e da superfamília EGFR nos carcinomas mamários esporádicos de cadelas, de responsabilidade de BRENO SOUZA SALGADO.

Nome do animal: _____

Nome do Responsável: _____

RG: _____ Data: ____ / ____ / ____

Assinatura: _____